DETECCIÓN DE OXIDO DE GRAFENO EN SUSPENSIÓN ACUOSA (*COMIRNATY*™ (RD1)

ESTUDIO OBSERVACIONAL EN MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA

Informe provisional (I)

28 de Junio de 2021

Prof. Dr. Pablo Campra Madrid

Doctor en Ciencias Químicas y Licenciado en Ciencias Biológicas

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERIA

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA, ESPAÑA

AVISO IMPORTANTE

Seguidamente se presenta un estudio microscópico, observacional y meramente descriptivo de la muestra problema.

La identificación definitiva del material dominante en la muestra precisa de ulteriores fraccionamientos y análisis espectroscópicos específicos que permitan caracterizar la estructura del material.

Antecedentes

- **D. Ricardo Delgado Martín** solicita PRESTACIÓN DE SERVICIOS de Investigación a la UAL denominada:

"DETECCIÓN DE GRAFENO EN MUESTRA DE SUSPENSIÓN ACUOSA"

- El 10/06/2021 se recibe por mensajería 1 vial, etiquetado con el texto siguiente:
  - ***"COMIRNATY™ .Sterile concentrate. COVID-19 mRNA. 6 doses after dilution.***
  - ***Discard date/time:PAA165994.LOT/EXP: EY3014 08/2021"***
- Procedencia y trazabilidad: se desconoce
- Estado de conservación: refrigerado
- Mantenimiento durante el estudio: refrigerado
- Codificación de la muestra problema a analizar: RD1

Observaciones preliminares de la muestra problema RD1

Descripción:

- Vial sellado, con goma y tapa de aluminio intactas, de 2ml de capacidad, conteniendo una suspensión acuosa turbia de 0,45 ml.
- Se realiza extracción y cuantificación de RNA
- Se observa presencia de microbiología nanométrica no caracterizada, visible a 600X en microscopio óptico

Procesamiento de la muestra

1. Dilución en suero fisiológico estéril al 0,9% (0,45 ml + 1,2 ml)
2. Fraccionamiento por polaridad: 1,2 ml hexano+120 ul de muestra RD1
3. Extracción de fase hidrofílica
4. Extracción y cuantificación de RNA en la muestra
5. Microscopía electrónica y ópticas de fase acuosa

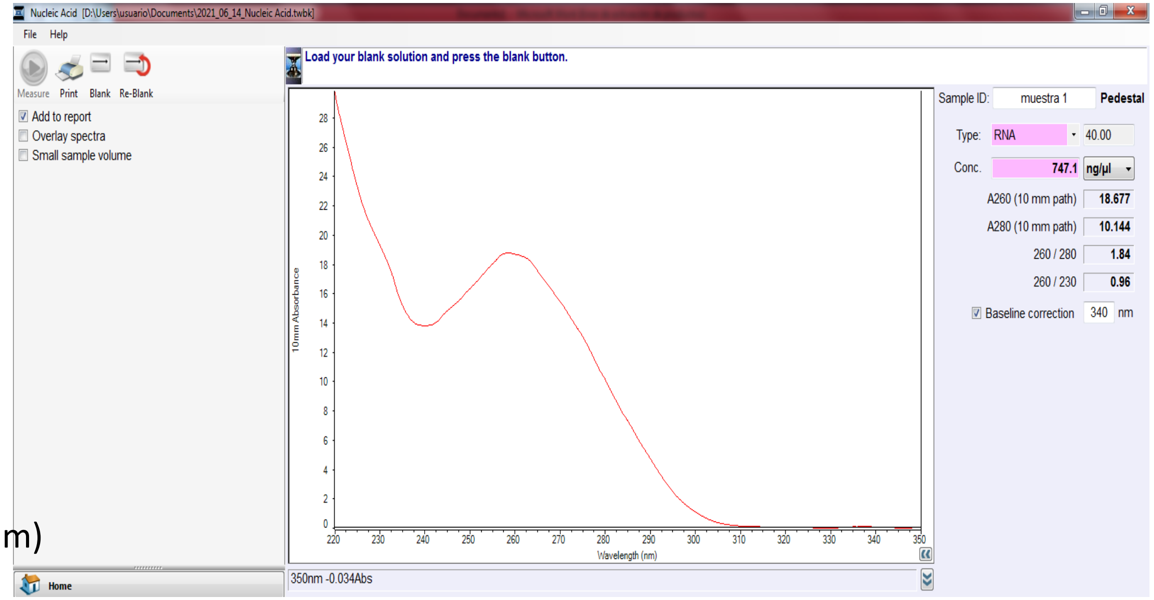
Análisis preliminar: extracción y cuantificación de Rna en la muestra

1. Extracción RNA: Kit https://www.fishersci.es/shop/products/ambion-purelink-rna-mini-kit-7/10307963

2. Cuantificación de absorbancia UV total en espectrofotómetro NanoDrop™ https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000#/ND-2000

3. Cuantificación específica de Rna por fluorescencia QUBIT2.0: https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/newsletters-and-journals/bioprobes-journal-of-cell-biology-applications/bioprobes-issues-2011/bioprobes-64-april-2011/the-qubit-2-0-fluorometer-april-2011.html

Espectro de absorción UV de la fase acuosa de la muestra RD1 (Equipo Nano-drop)



Máximo de absorción de la MUESTRA RD1 (260-270 nm)

- RNA. Presenta máximos habituales a 260 nm. Concentración total estimada por fluorometria QUBIT2.0 : **6 ng/ul**
- El espectro revela presencia de elevada cantidad de sustancias o sustancia diferentes al Rna con máximo de absorción en la misma región, con un total estimado en **747 ng/ul** (estimación no calibrada)
- El oxido de grafeno reducido (RGO) presenta máximos de absorción a 270 nm, **compatibles** con el espectro obtenido (*Thema et al, 2013. Journal of Chemistry ID 150536)*
- **El máximo de absorción obtenido NO PERMITE DESCARTAR la presencia de grafeno en la muestra. La cantidad mínima de RNA detectado por QUBIT2.0 sólo explica un porcentaje residual de la absorción total UV de la muestra.**

OBJETIVO: Identificación microscópica de derivados de grafeno

METODOLOGIA:

1. Toma de imágenes en microscopia óptica y electrónica
2. Comparativa con imágenes de literatura y patrón de oxido de grafeno reducido

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

Microscopio electrónico JEM-2100Plus

Tensión: 200 kV

Resolución 0,14 nm
Aumento hasta x1.200.000

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

La microscopía electrónica (TEM) se utiliza habitualmente para obtener imágenes de nanomateriales de grafeno. Se ha convertido en un instrumento bastante estándar y fácil de usar que es capaz de obtener imágenes de láminas de grafeno en capas individuales.

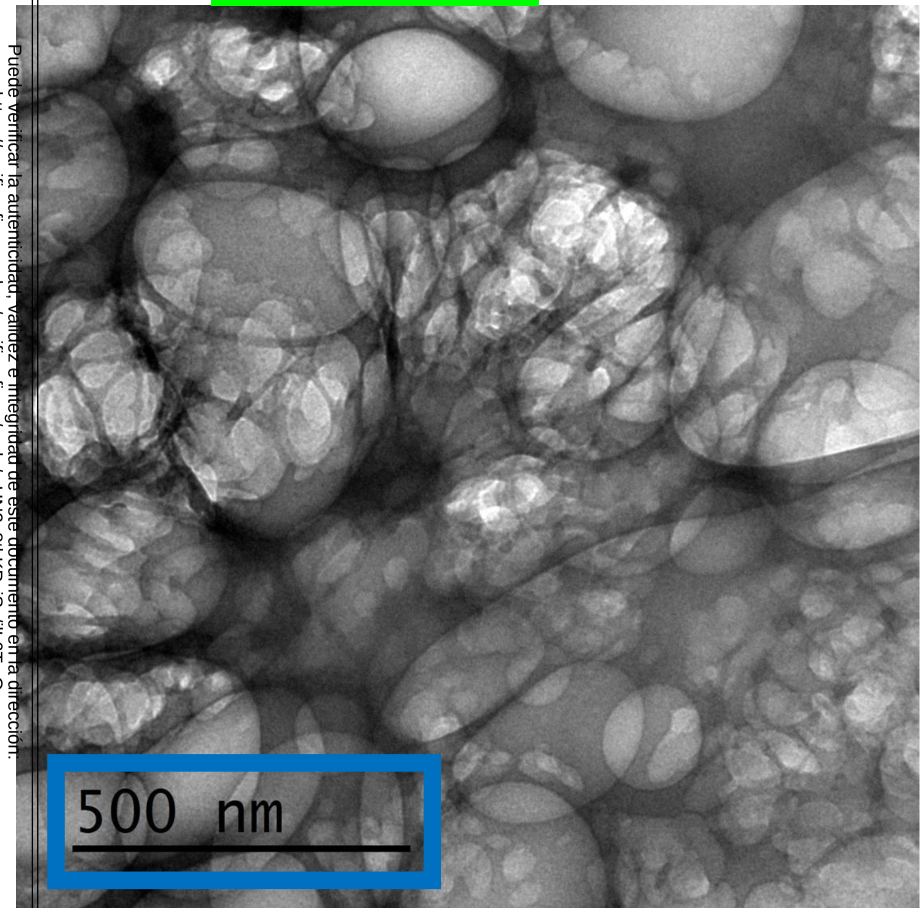
DESCRIPCIÓN DE LA IMAGEN anterior

(de: *Choucair et al, 2009. Gram-scale production of graphene based on solvothermal synthesis and sonication. Nature Nanotechnology 4(1):30-3*

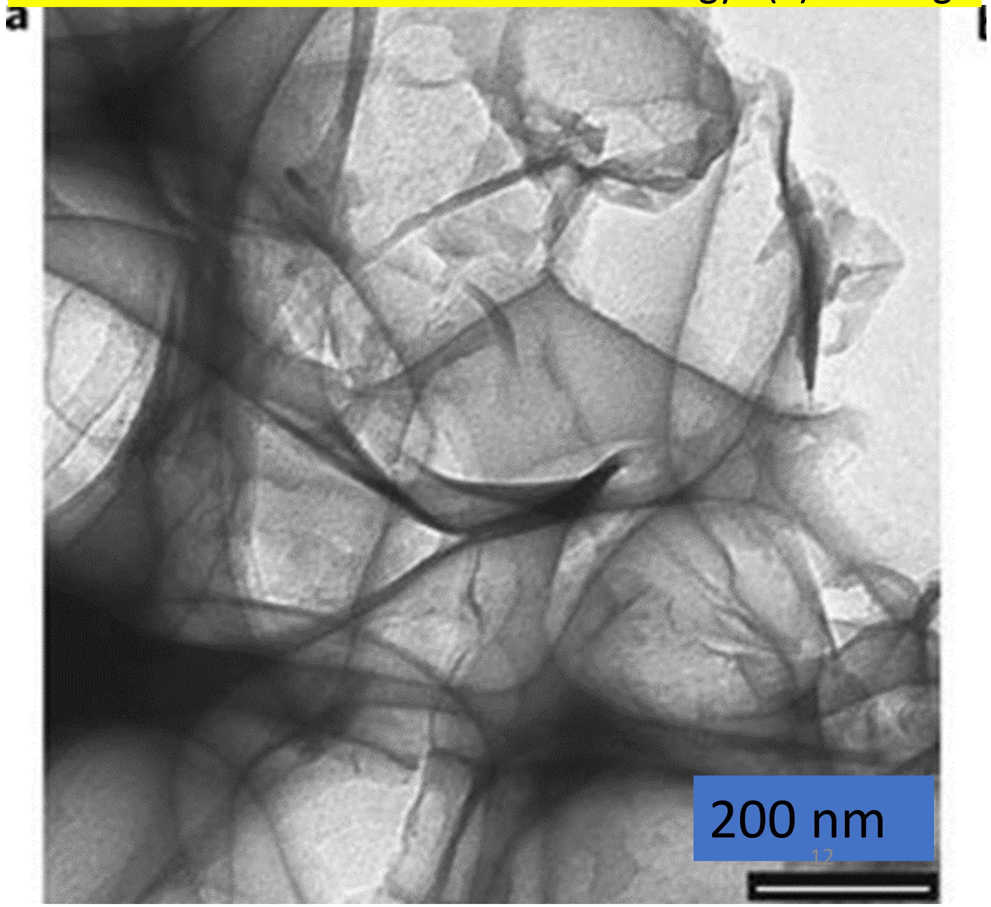
- Figura 2: “*Imágenes TEM de las* ***láminas de grafeno aglomeradas****. La misma región de muestra se ve con diferentes aumentos y muestra claramente el grado de formación de la lámina y* ***la tendencia de las láminas a fusionarse en regiones superpuestas.*** *Es evidente una estructura inherente en forma de lámina que muestra* ***una intrincada matriz de pliegues de largo alcance****. Como las imágenes se toman en modo de transmisión, la opacidad relativa de las láminas individuales es el resultado de regiones interfaciales con superposición entre láminas individuales. Las láminas se extienden en dimensiones laterales sobre escalas de longitud micrométrica, que van desde 100 nm hasta más de 1.000 nm.”*

RESULTADOS: Comparativa de muestra problema (RD1) con una imagen TEM de literatura

MUESTRA RD1

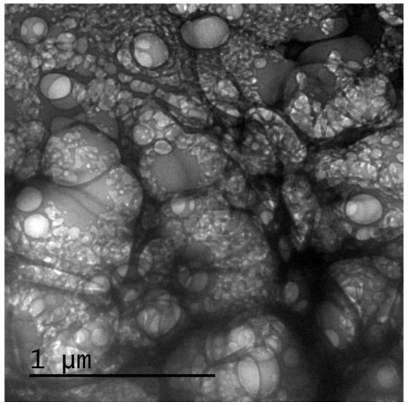


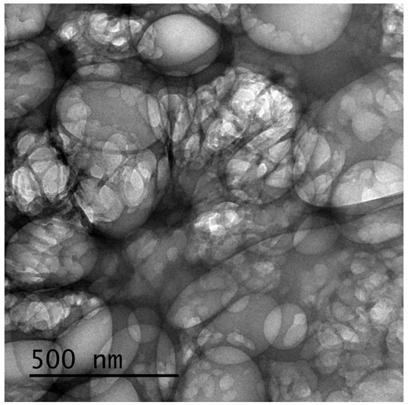
Choucair et al 2009. Nature Nanotechnology 4(1):30-3 Fig 2

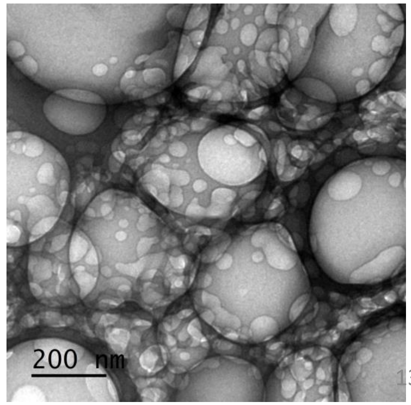


RESULTADOS: DESCRIPCIÓN DE LAS IMAGENES TEM DE LA MUESTRA PROBLEMA RD1

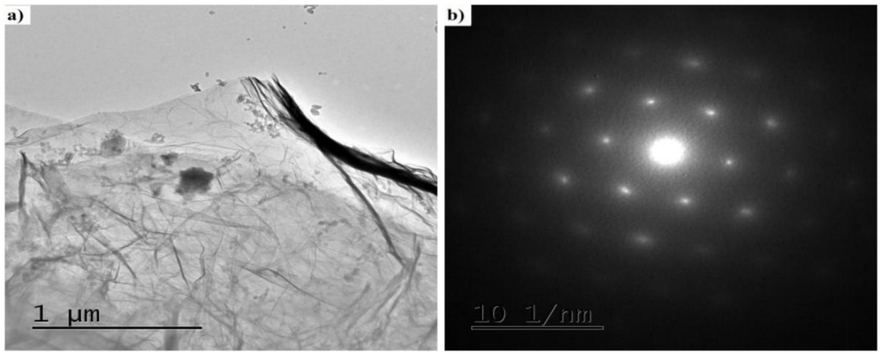
Las imágenes TEM de la muestra RD1 **en general PRESENTAN UNA ELEVADA SEMEJANZA** con imágenes de **oxido de grafeno** de literatura obtenidas por la misma técnica TEM, con aumentos parecidos. Se puede observar una intrincada **matriz** o **malla de láminas flexibles translucidas plegadas sobre sí mismas**, con mezcla de aglomeraciones multicapa más oscuras y de monocapas no plegadas de color mas claro. Aparecen zonas lineares más oscuras debidas a la superposición local de láminas y a la disposición local de láminas individuales en paralelo al haz de electrones. Tras la malla aparece una elevada densidad de **formas claras redondeadas y elípticas sin identificar,** posiblemente correspondientes a orificios generados por forzamiento mecánico de la malla durante el tratamiento. Mostramos aquí 3 imágenes con aumento progresivo:







- **NOTA importante**: Para una IDENTIFICACIÓN definitiva del GRAFENO por TEM, es necesario complementar la observación con la caracterización estructural mediante obtención por EDS de un PATRÓN DE DIFRACCIÓN DE ELECTRONES característico (como la figura b mostrada abajo). El patrón correspondiente al grafito o el grafeno presenta una simetría hexagonal, y generalmente cuenta con varios hexágonos concéntricos. **No ha sido posible por el momento obtener este patrón por la escasez de muestra disponible para su procesamiento, y la disposición caótica y la densidad de los pliegues.**



Matéria (Rio J.) 23 (1) • 2018 • Characterization of graphene nanosheets obtained by a modified Hummer's method. Renata Hack et al.

Microscopio Óptico

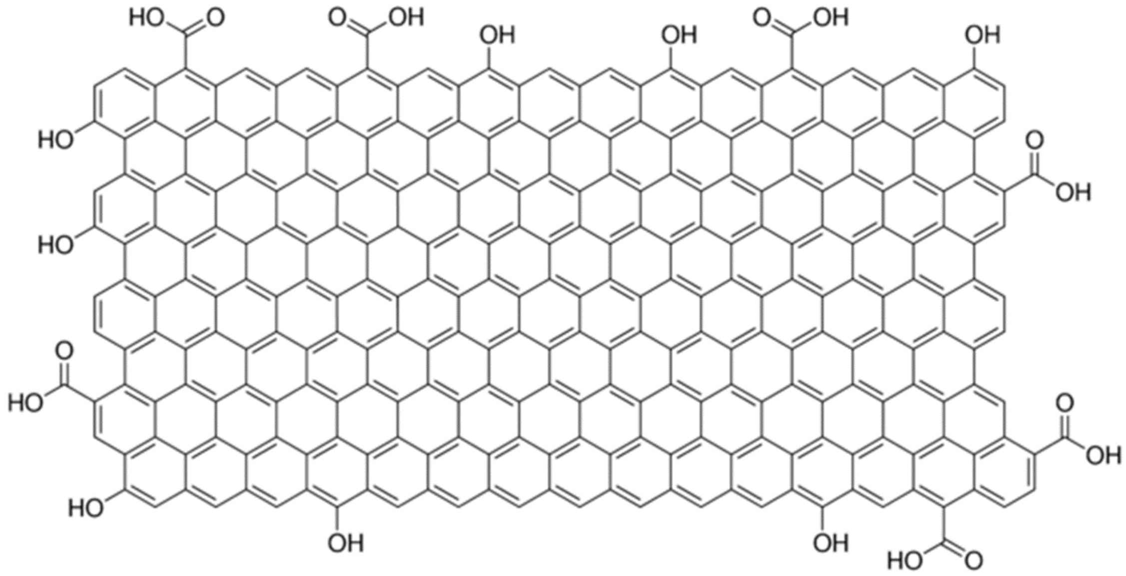
Microscopio Biológico CX43

Objetivos PLAN Fluor de 10x, 20x (DIC) y 40x (DIC)
Ocular: 10x

- Condensador ajustado en posición intermedia con efecto 3D (entre campo Claro (BF) y campo oscuro (DF)

PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO

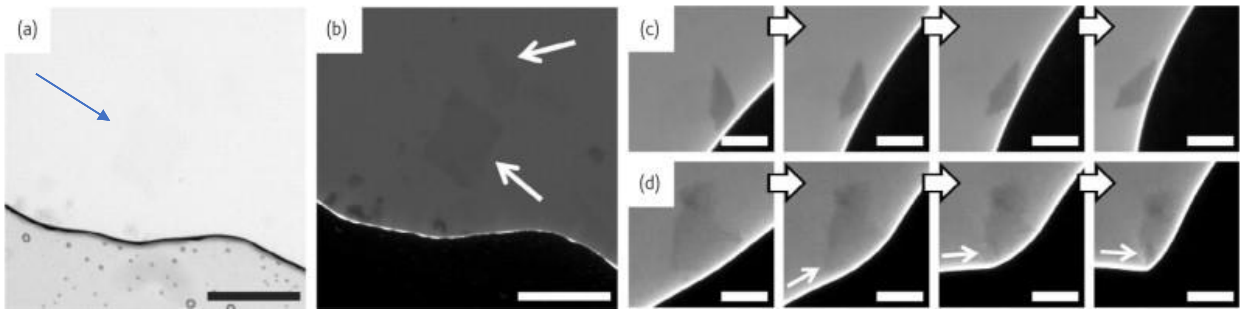




INDENTIFICACIÓN DE OXIDO DE GRAFENO Y SUS CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES POR MICROSCOPIA OPTICA

Los materiales de grafeno esencialmente constan de una sola capa atómica. Esto hace que la observación del microscopio óptico basado en absorbancia sea difícil, aunque es posible adquirir imágenes ópticas de láminas de grafeno suspendidas bajo luz transmitida de campo claro (Fig. a). El grafeno oxidado (GO) tiene un color mucho más pálido que le reducido (rGO).

Sin embargo, bajo **iluminación reflectante,** la obtención **de imágenes ópticas de alto contraste de grafeno** e incluso láminas de GO se ha reportado en literatura. Modificando el ángulo de incidencia de la iluminación, mediante ajuste apropiado del condensador (campo claro y campo oscuro), esta ha sido la técnica empleada para aumentar el contraste en muestra RD1 del presente informe y obtener imágenes de la rugosidad en la superficie de las láminas con efecto 3D.

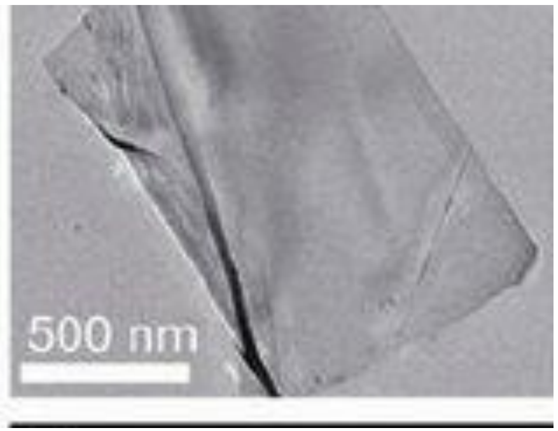


a) Campo claro. b-d) Microscopía de extinción de fluorescencia (FQM)
Kim et al, 2010. Seeing graphene-based sheets, Materials Today, Volume 13, 2010,Pages 28-38,

Imagen de literatura
TEM de bajo aumento

"La figura muestra una imagen TEM de grafeno bicapa con bordes que tienden a enrollarse y doblarse ligeramente"

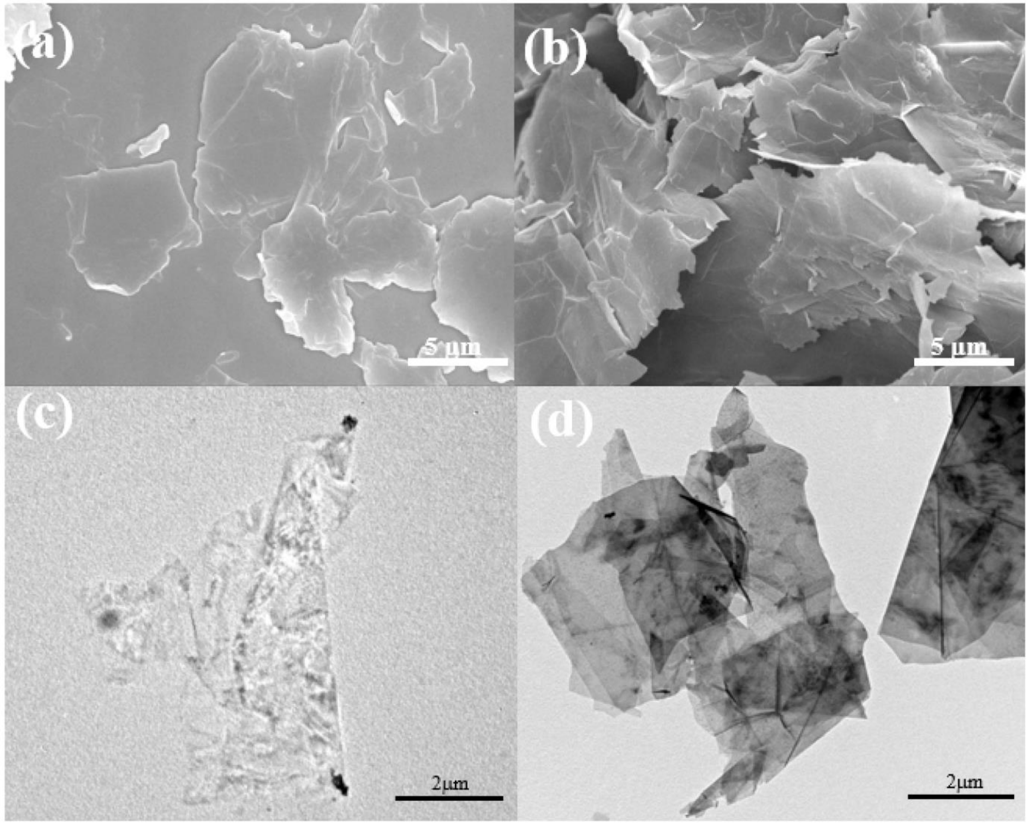
Qian, W., Hao, R., Hou, Y. et al. Solvothermal-assisted exfoliation process to produce graphene with high yield and high quality. Nano Res. 2, 706–712 (2009).



IMAGENES DE LITERATURA. MICROSCOPIA ELECTRONICA A BAJO AUMENTO
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM) (a) y (b) y TRANSMISION (TEM) (c) y (d)

Effects of Graphene Nanosheets with Different Lateral Sizes as Conductive Additives on the Electrochemical Performance of LiNi0.5Co0.2Mn0.3O2 Cathode Materials for Li Ion Batteries. Figure 2. SEM images of different graphene sheet sizes: (**a**) GN-13 and (**b**) GN-28, and transmission electron microscopy **(TEM)** images of different graphene sheet sizes: (**c**) GN-13 and (**d**) GN-28.

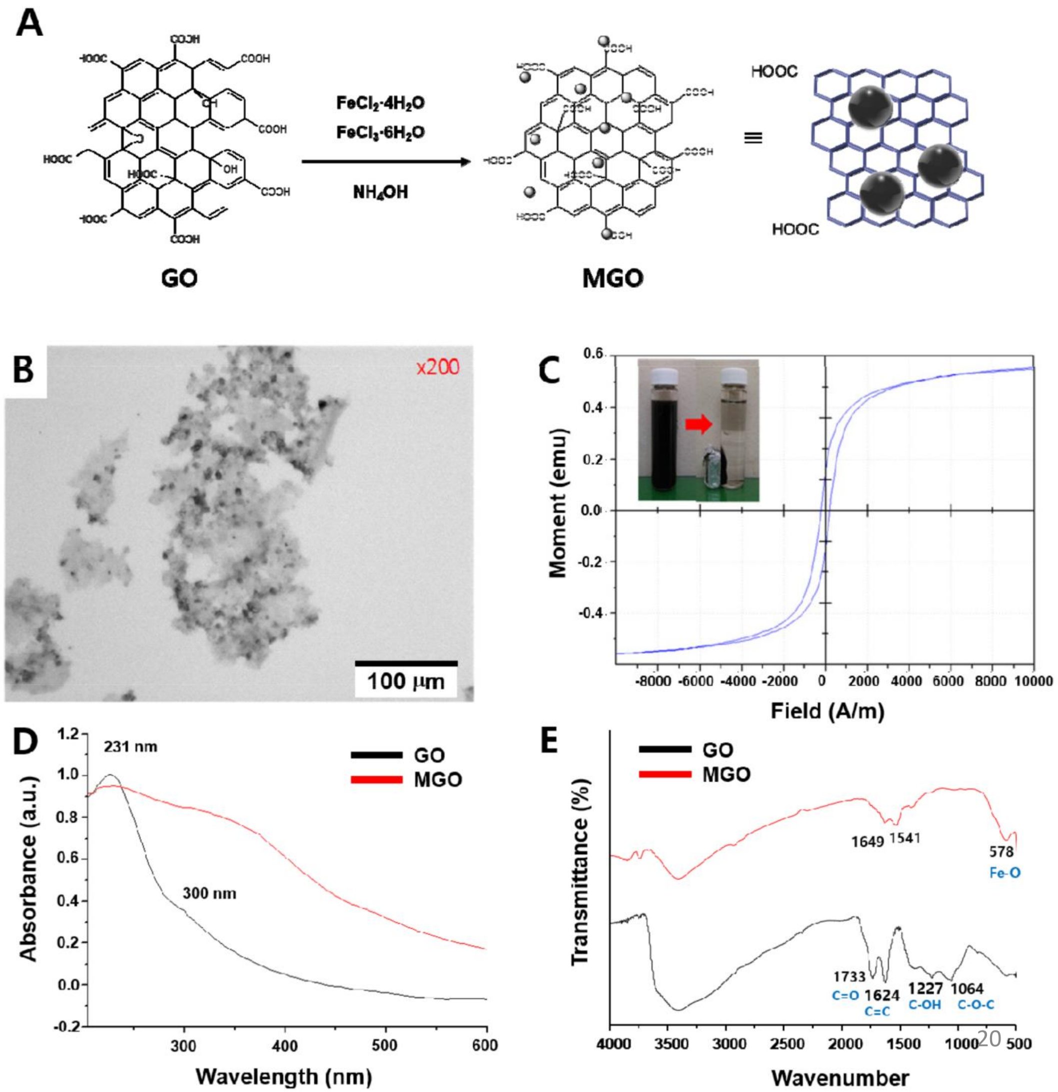
Husu et al. Polymers 2020, 12(5), 1162



Robust Magnetized Graphene Oxide Platform for In Situ Peptide Synthesis and FRET-Based Protease Detection

Kim et al, *Sensors* **2020**, *20*(18), 5275

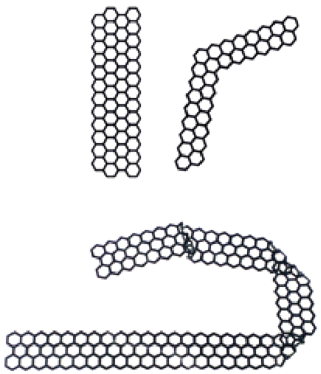
Figure 1. Preparation and characterization of graphene oxide (GO) and magnetic graphene oxide (MGO). (A) Schematic of MGO synthesis procedure. (B) **Optical microscopy image of MGO**. (C) Magnetic hysteresis loop of MGO. (D) UV/Vis absorption spectra of GO and MGO. (E) FT-IR spectra of GO and MGO.



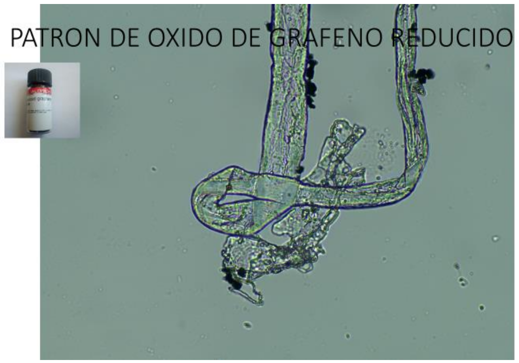
Comparativa de muestra RD1 al microscopio óptico con imágenes del patrón de OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO (rGO)

Las imágenes ópticas de las láminas presentes en la muestra RD1 revelan gran similitud con las láminas exfoliadas a partir de sonicación del patrón rGO. Ambas muestras presentan láminas translúcidas interiormente rugosas, con perfiles irregulares, plegadas sobre sí mismas y con tendencia a enrollarse en los bordes. Las formas y dimensiones de las láminas son muy variables, presentando en ambas muestras láminas en cintas o bandas plegadas sobre sí mismas (*ribbons*).

En el ANEXO adjunto se muestran imágenes alternas de MUESTRA PATRON DE rGO y MUESTRA PROBLEMA RD1



PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO



MUESTRA RD1



https://cen.acs.org/articles/86/i4/Graphene-Ribbons.html

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El estudio microscópico de la muestra aporta **sólidas evidencias de presencia probable de derivados de grafeno, si bien la microscopía no proporciona una prueba concluyente**. La identificación definitiva de grafeno, grafeno oxidado (GO) o grafeno oxidado reducido (rGO)en la muestra RD1 precisa de la **CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL** mediante el análisis de patrones espectrales específicos comparables a los publicados en literatura y a los obtenidos a partir de muestra patrón, obtenidos con técnicas espectroscópicas como XPS, EDS, RMN, FTIR o Raman, entre otras.

2. Los análisis de este informe corresponden a **UNA SOLA MUESTRA, limitada en volumen total disponible para procesar.** Es por tanto necesario realizar un muestreo significativo de viales similares para extraer conclusiones generalizables a muestras comparables, registrando origen, trazabilidad y control de calidad durante la conservación y transporte previas a los análisis.

Exención de responsabilidad

UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA

- **Los resultados y conclusiones de este informe no implican posición institucional alguna de la Universidad de Almería**
- Ni el Investigador Principal ni La Universidad de Almería asumen responsabilidad alguna de los contenidos y opiniones de terceros sobre el presente informe a partir de su posible difusión en redes sociales o medios de comunicación, ni de las conclusiones que puedan extraerse del mismo que no hayan sido explicitadas en el texto.

VER ANEXO FOTOGRAFIAS DE LA MUESTRA

DETECCIÓN DE OXIDO DE GRAFENO EN SUSPENSIÓN ACUOSA (*COMIRNATY™* (RD1)

ESTUDIO OBSERVACIONAL EN MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA

Informe provisional (I)

ANEXO FOTOGRAFIAS

28 de Junio de 2021

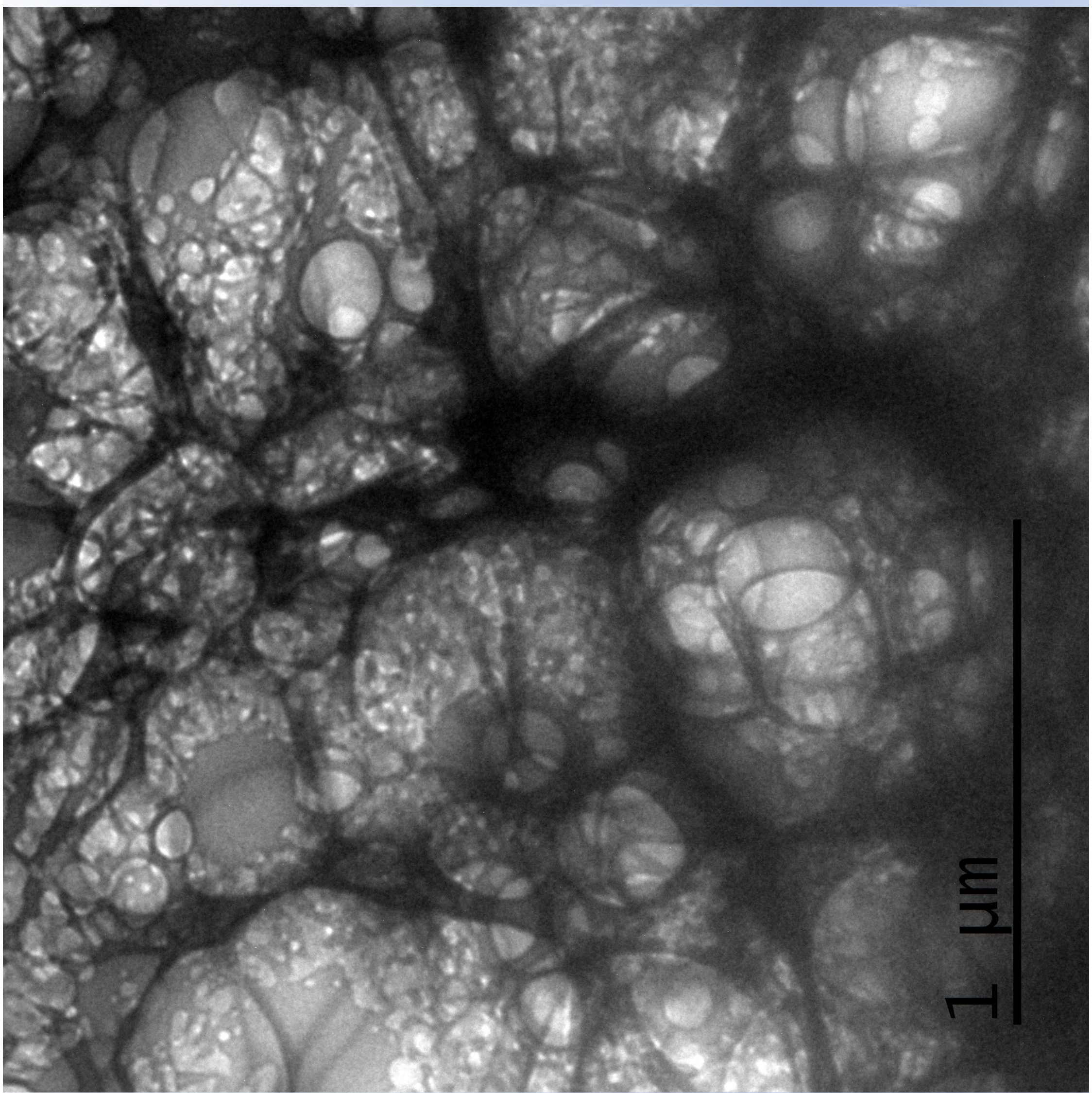
Prof. Dr. Pablo Campra Madrid

Doctor en Ciencias Químicas y Licenciado en Ciencias Biológicas

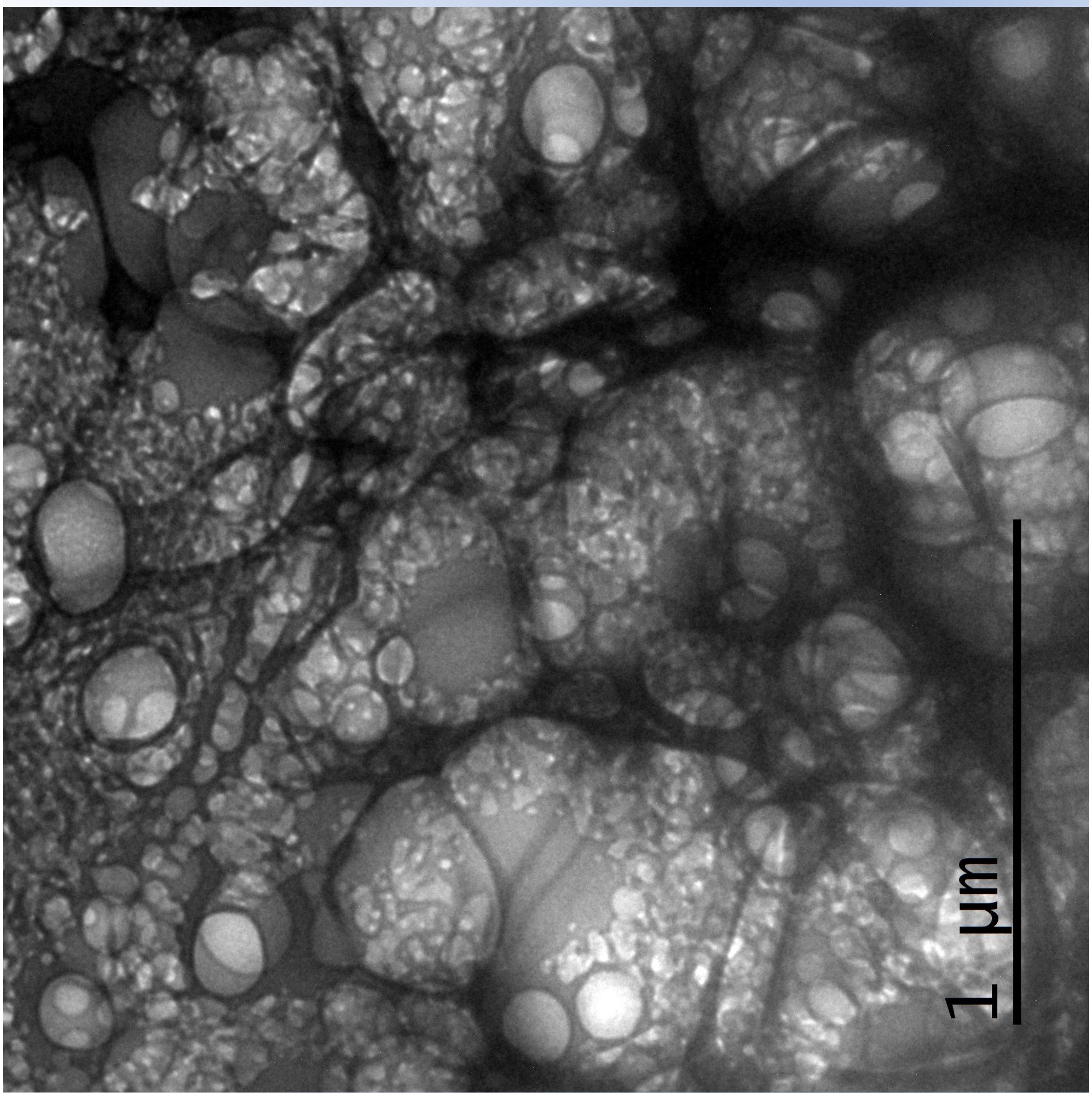
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERIA

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA, ESPAÑA

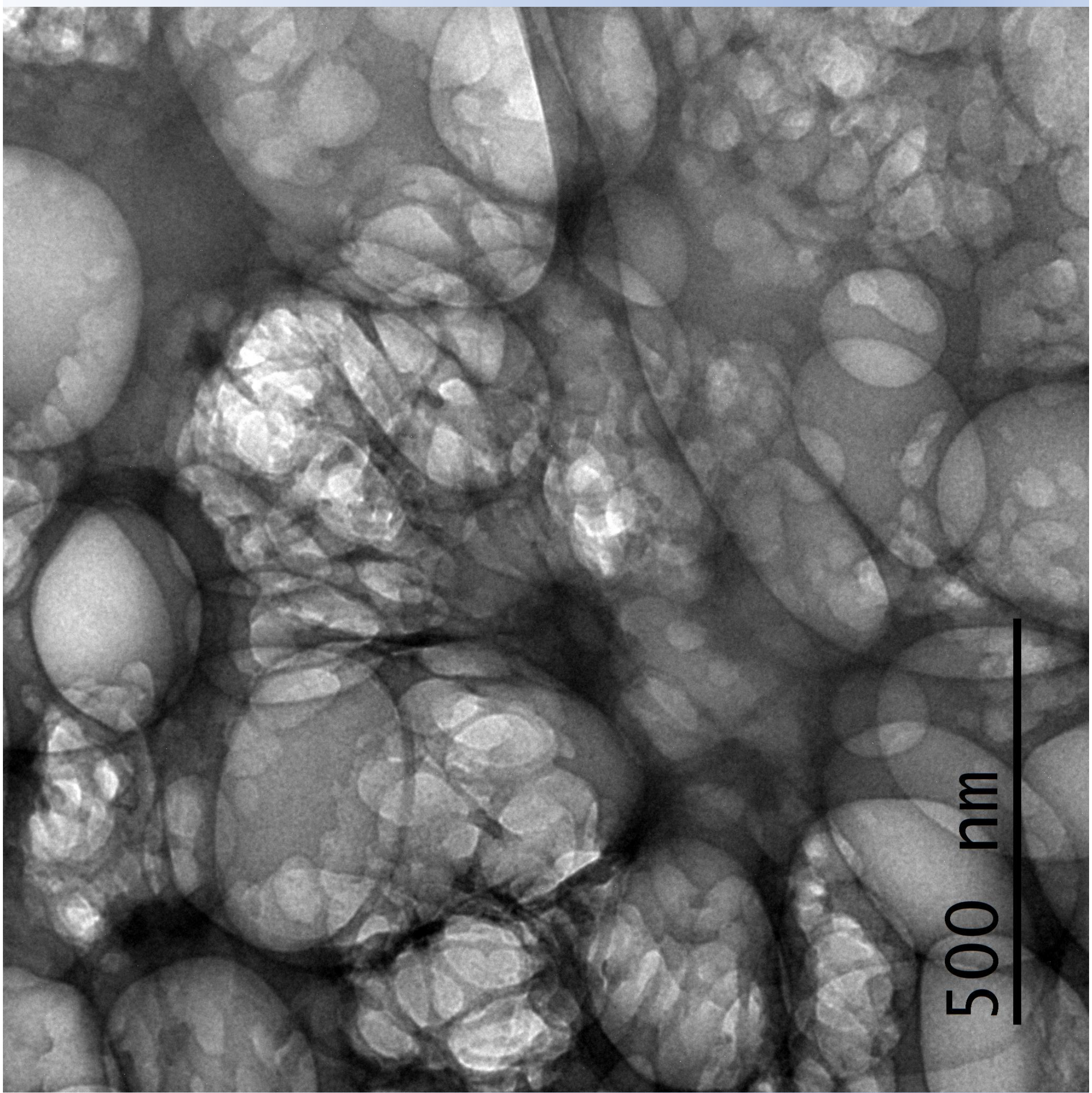
MICROSCOPÍA ELECTRONICA



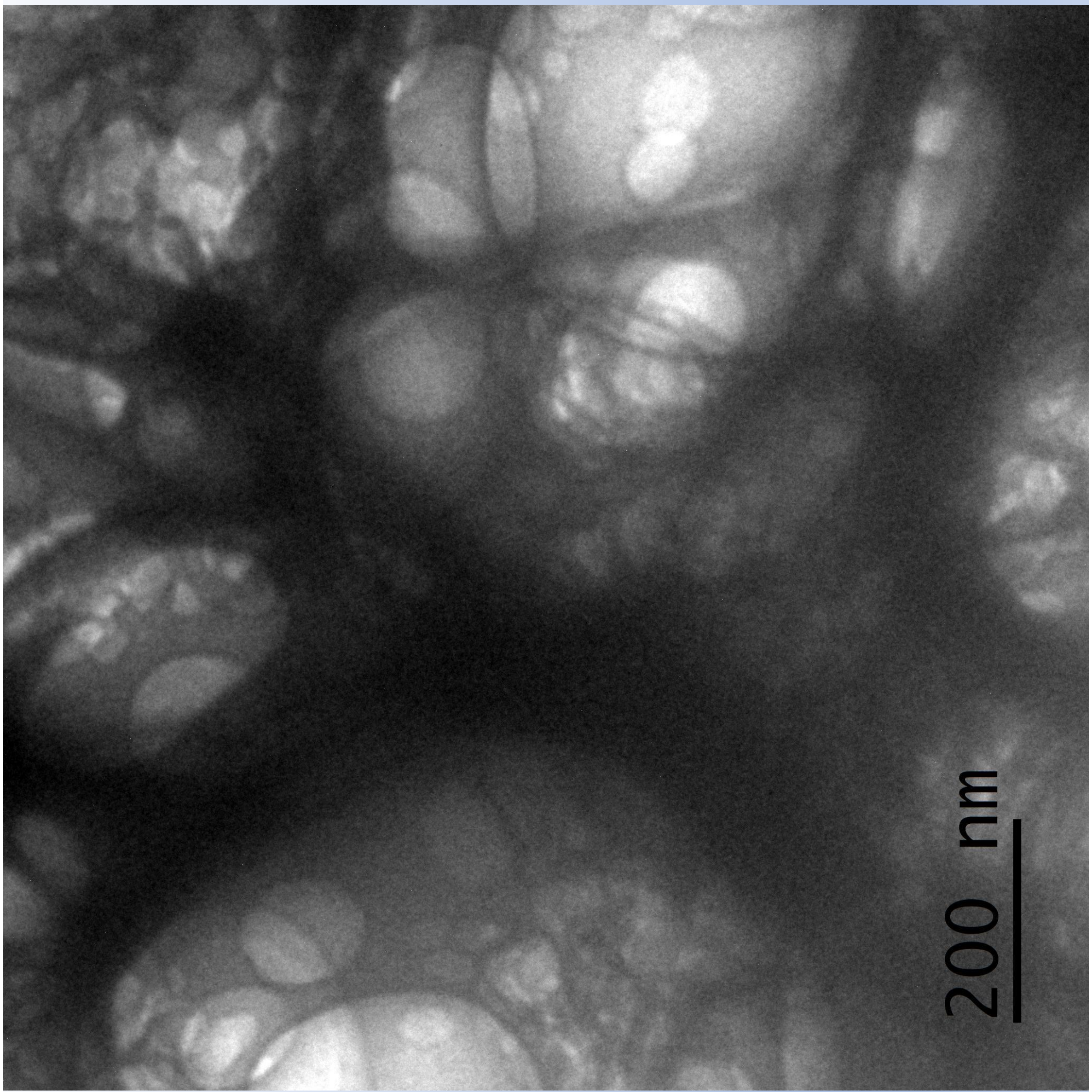
MUESTRA
RD1



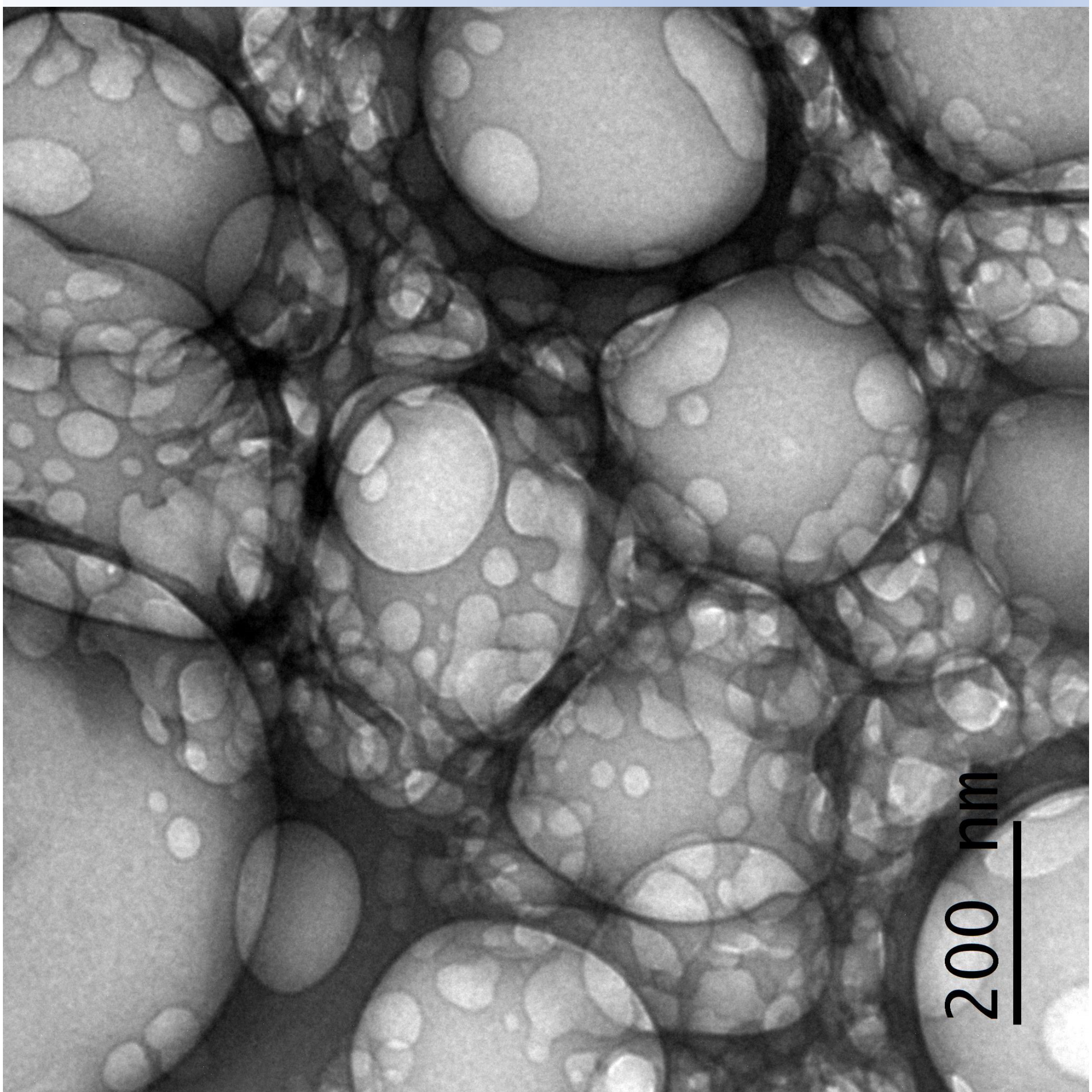
MUESTRA RD1



MUESTRA
RD1

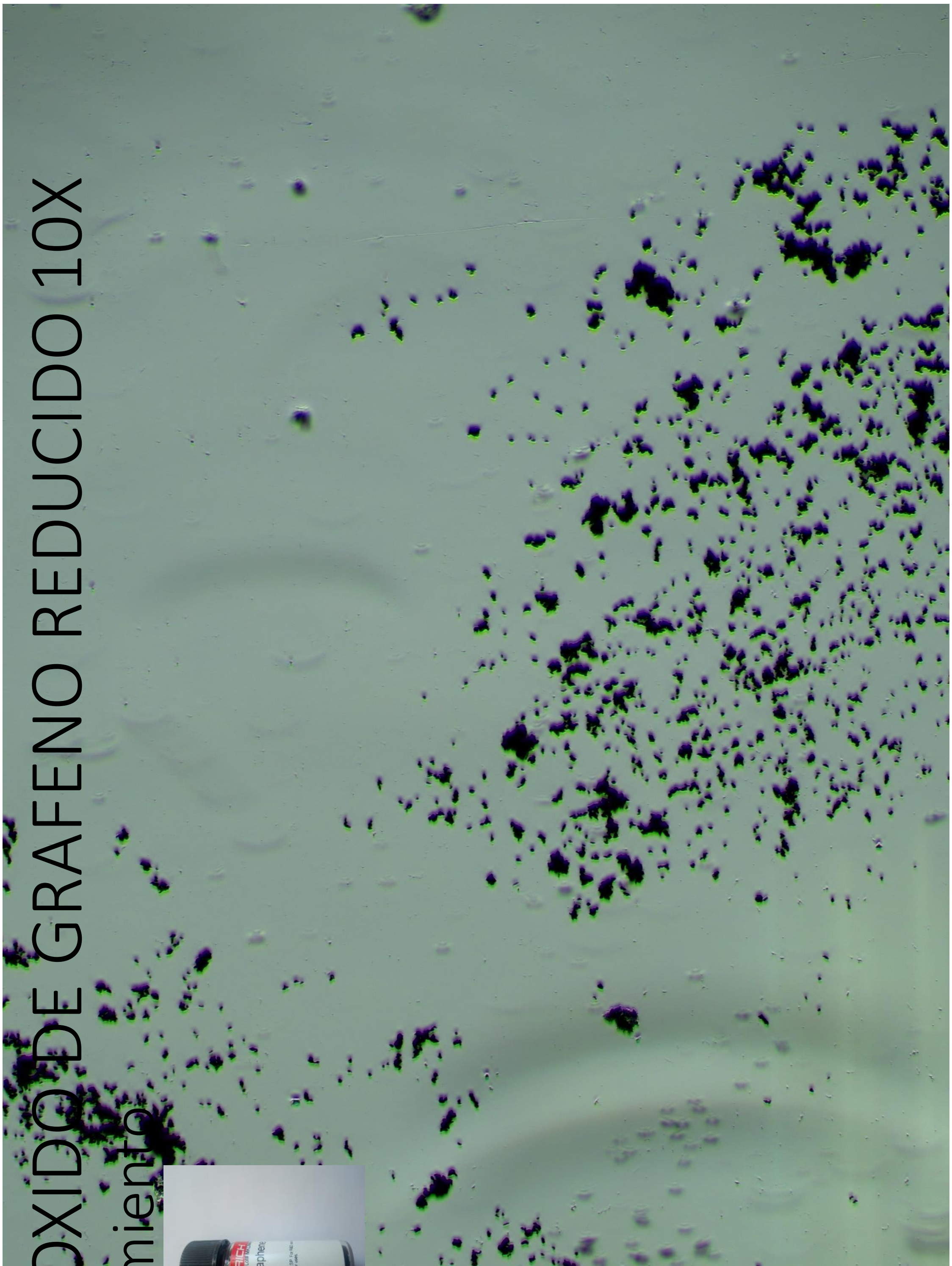


MUESTRA
RD1



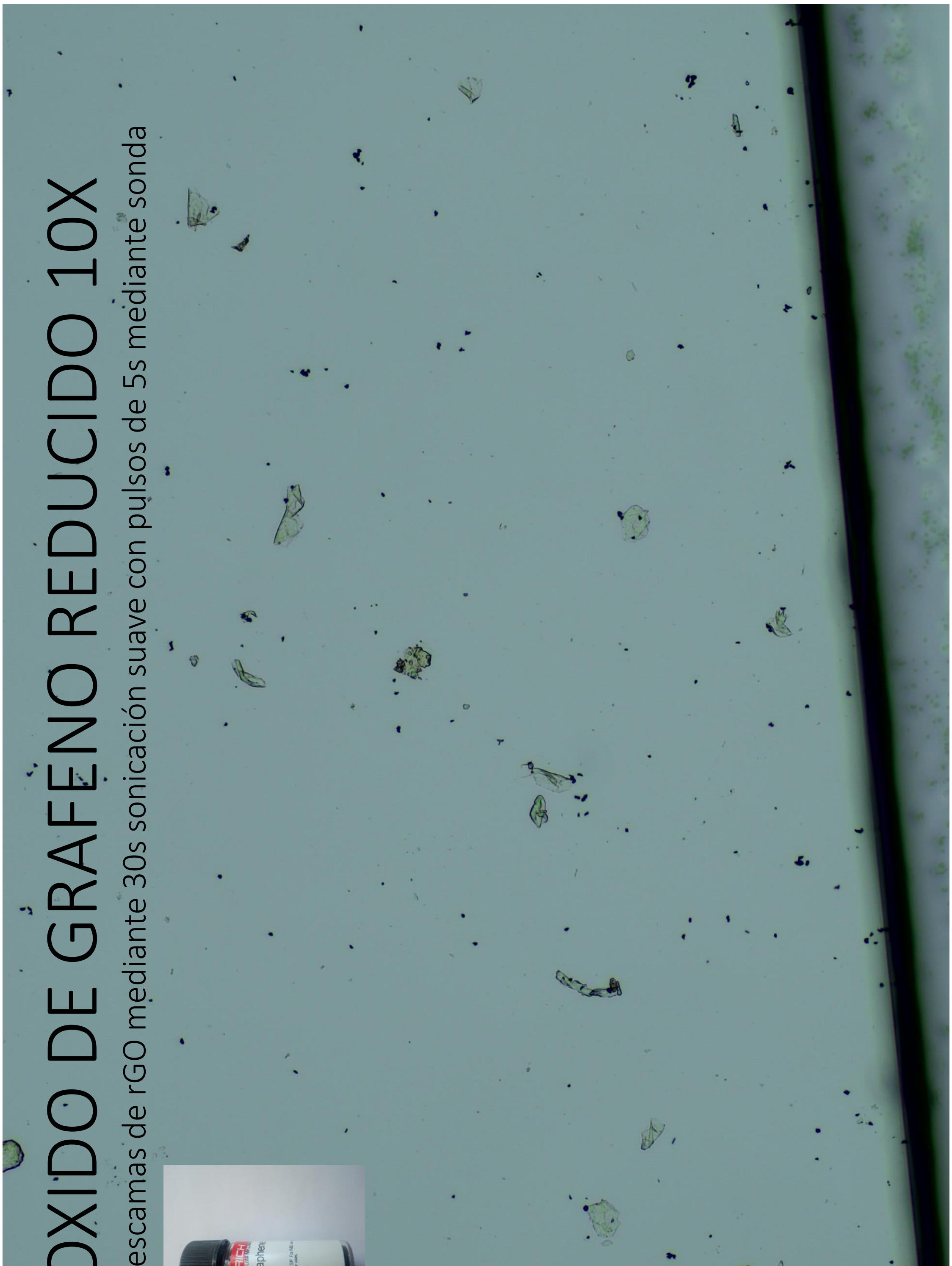
MUESTRA
RD1

MICROSCOPÍA OPTICA



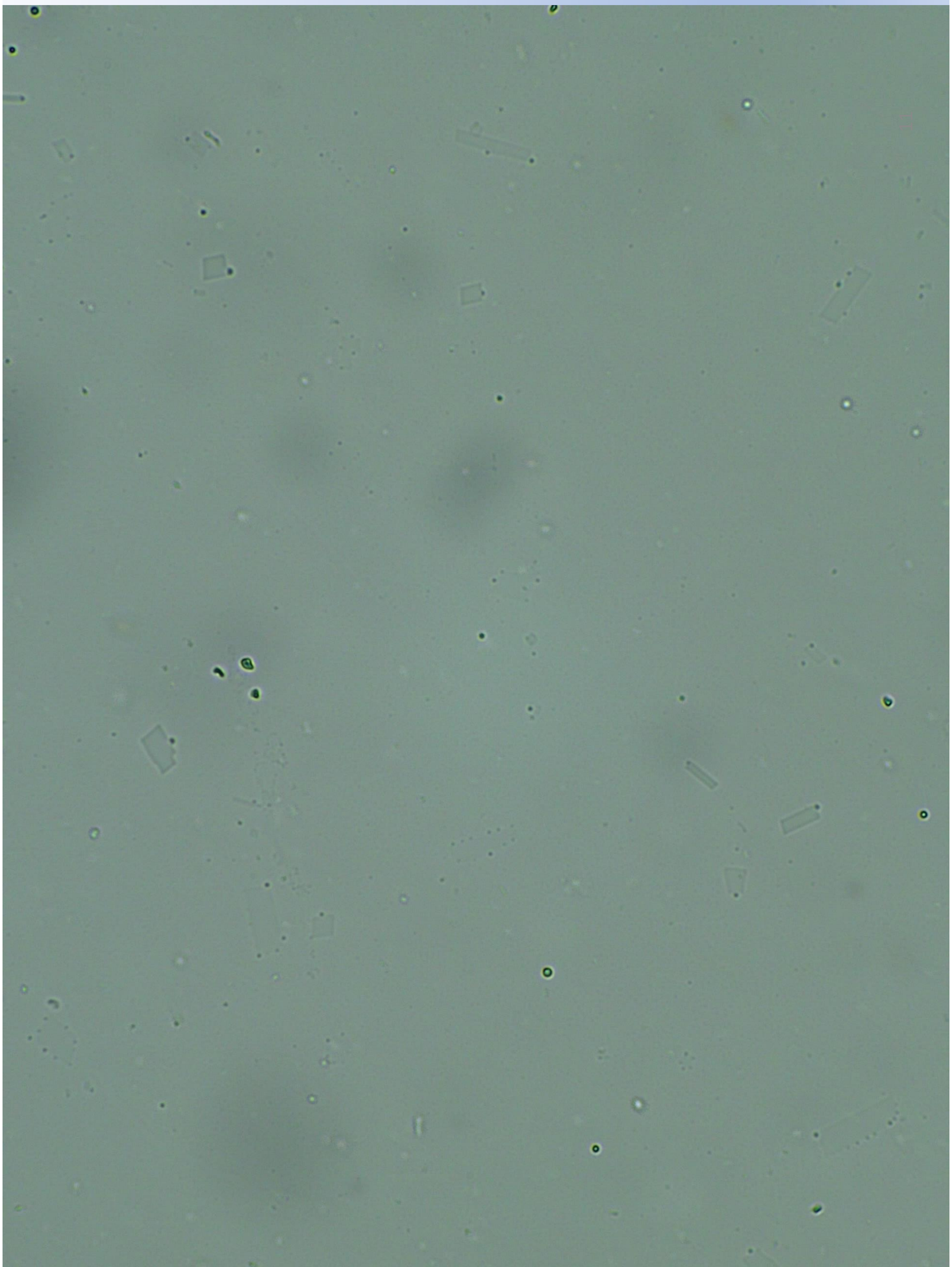
PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO 10X

Antes del tratamiento

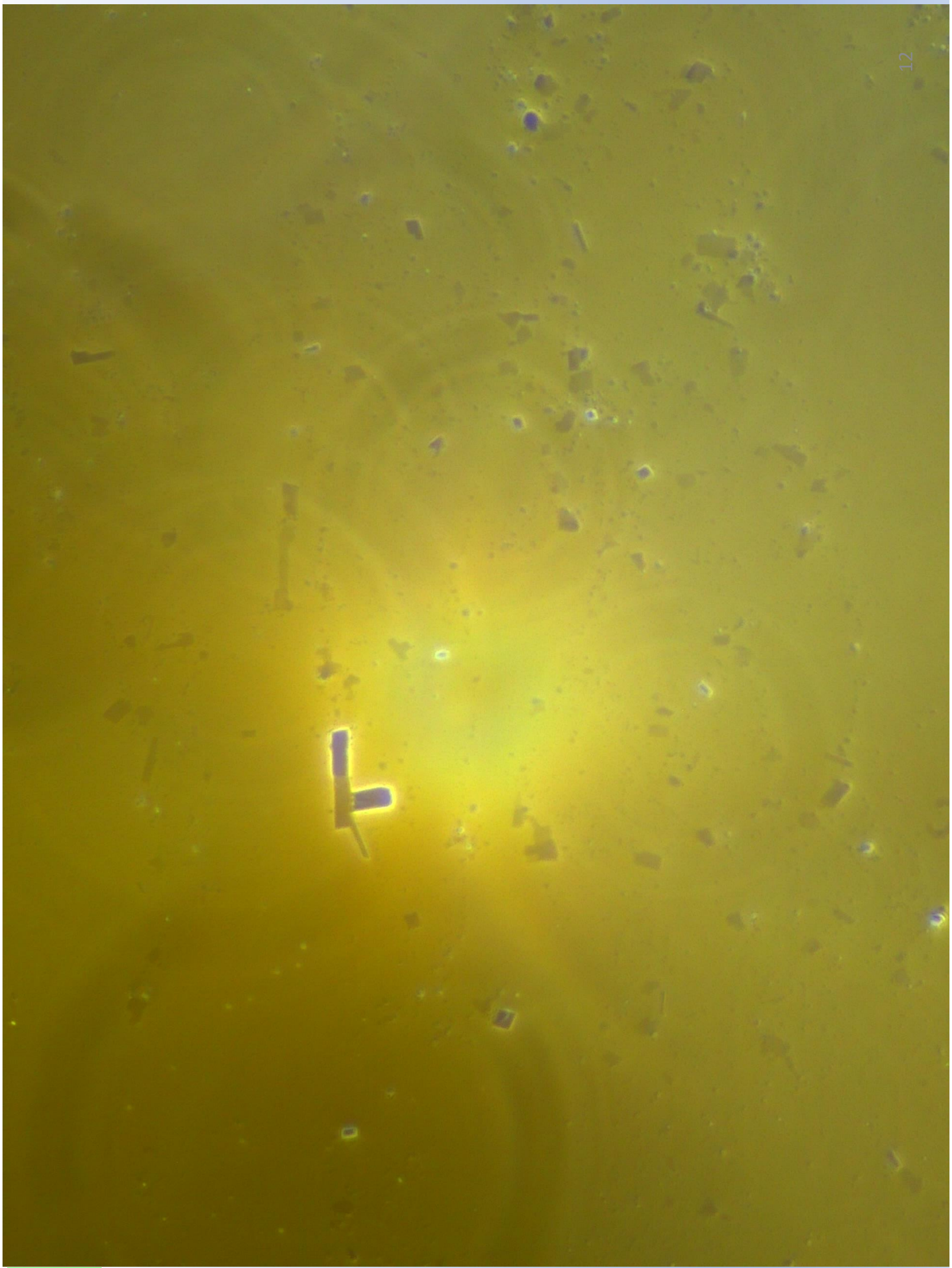


PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO 10X

Tratamiento: Exfoliación de escamas de rGO mediante 30s sonicación suave con pulsos de 5s mediante sonda

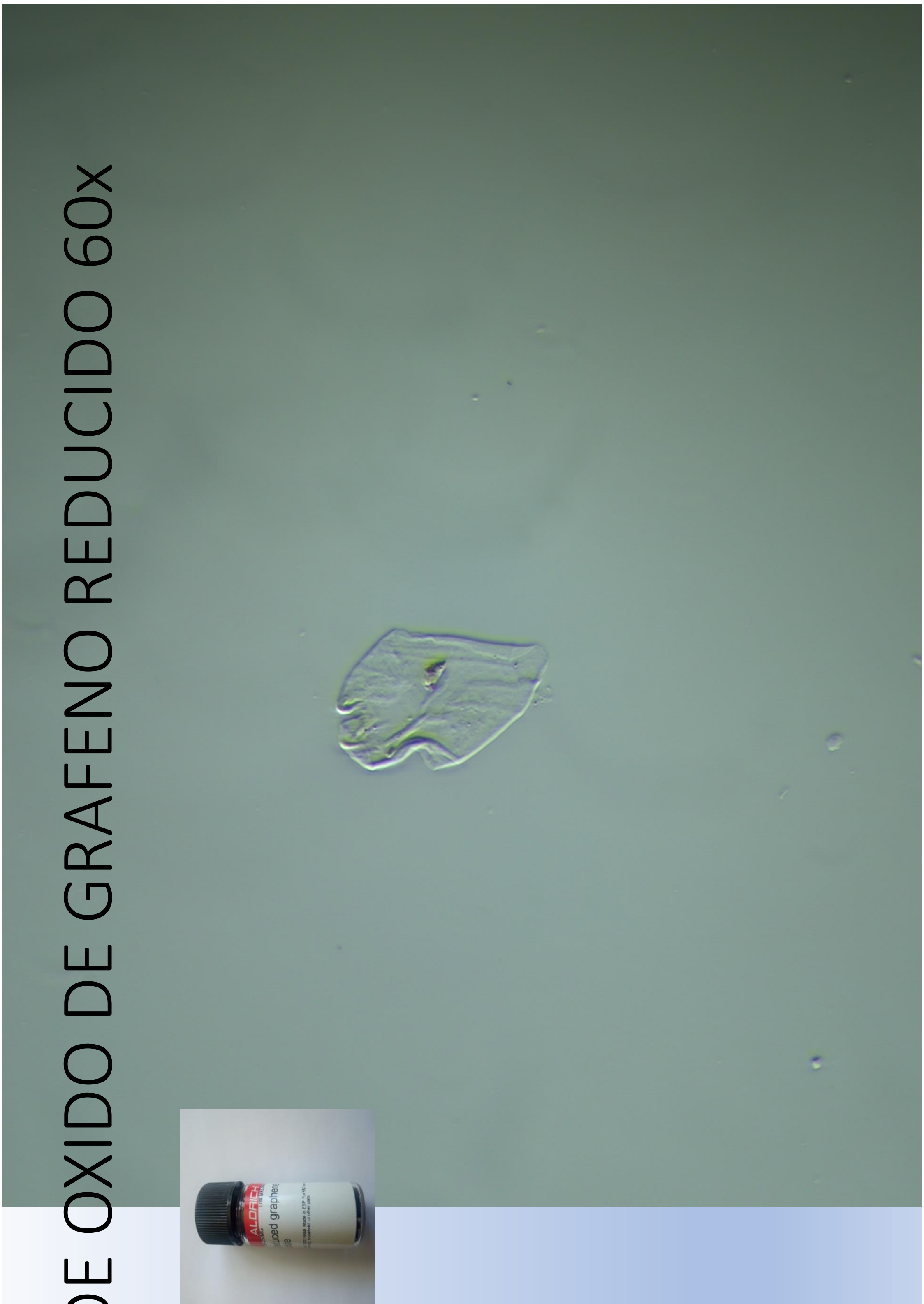


MUESTRA RD1



MUESTRA RD1 (campo oscuro)

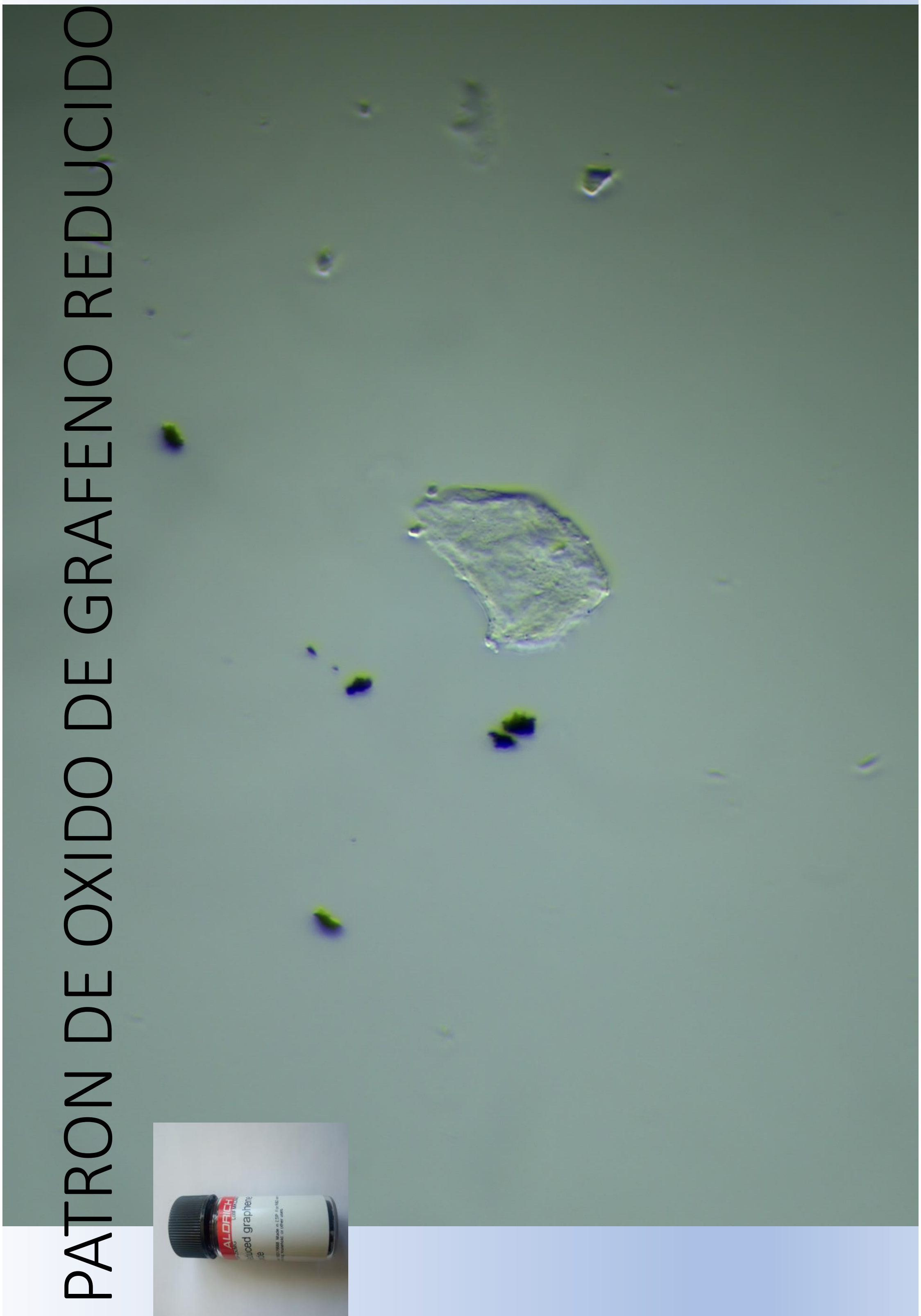
PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO 60x

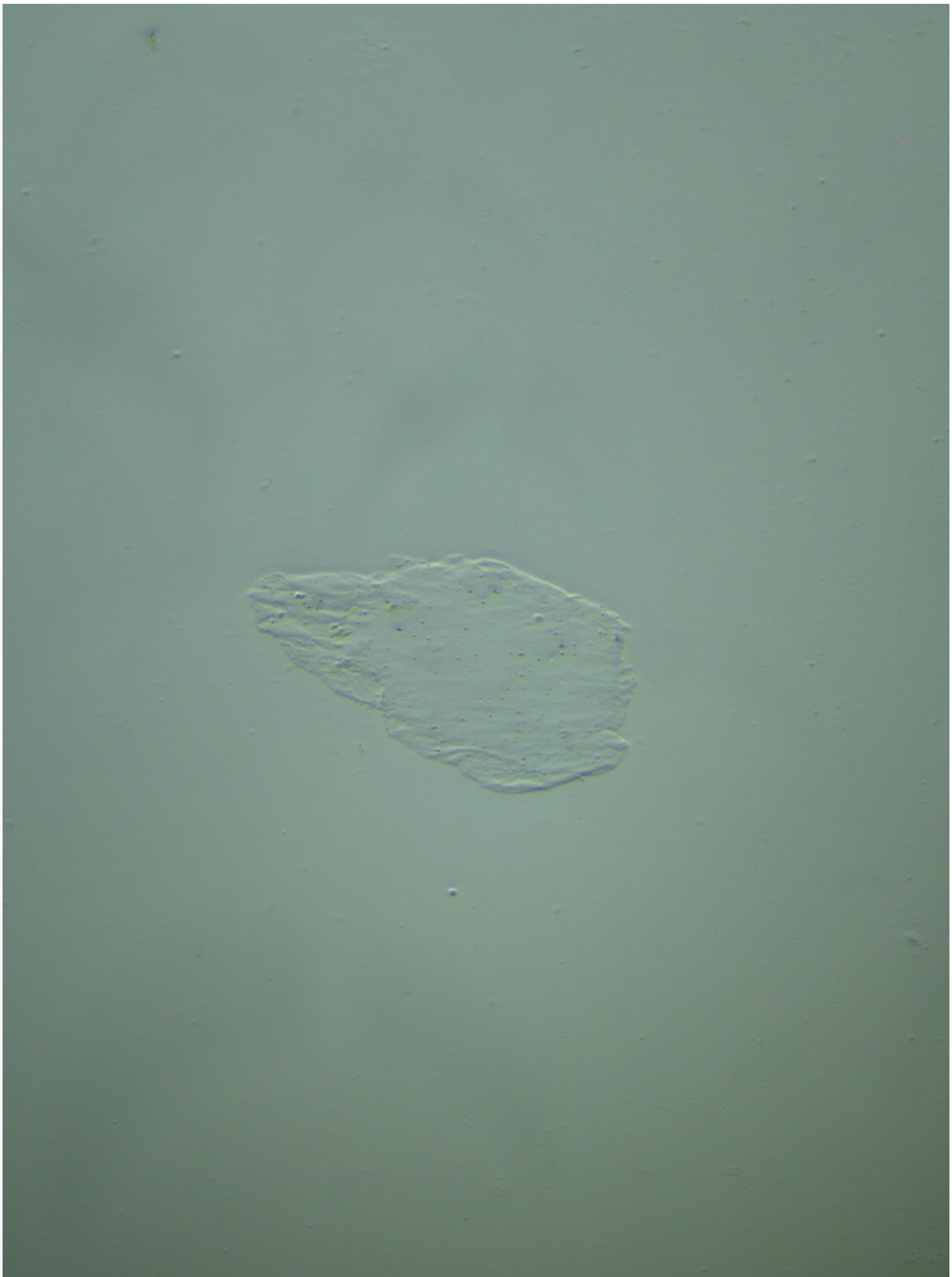




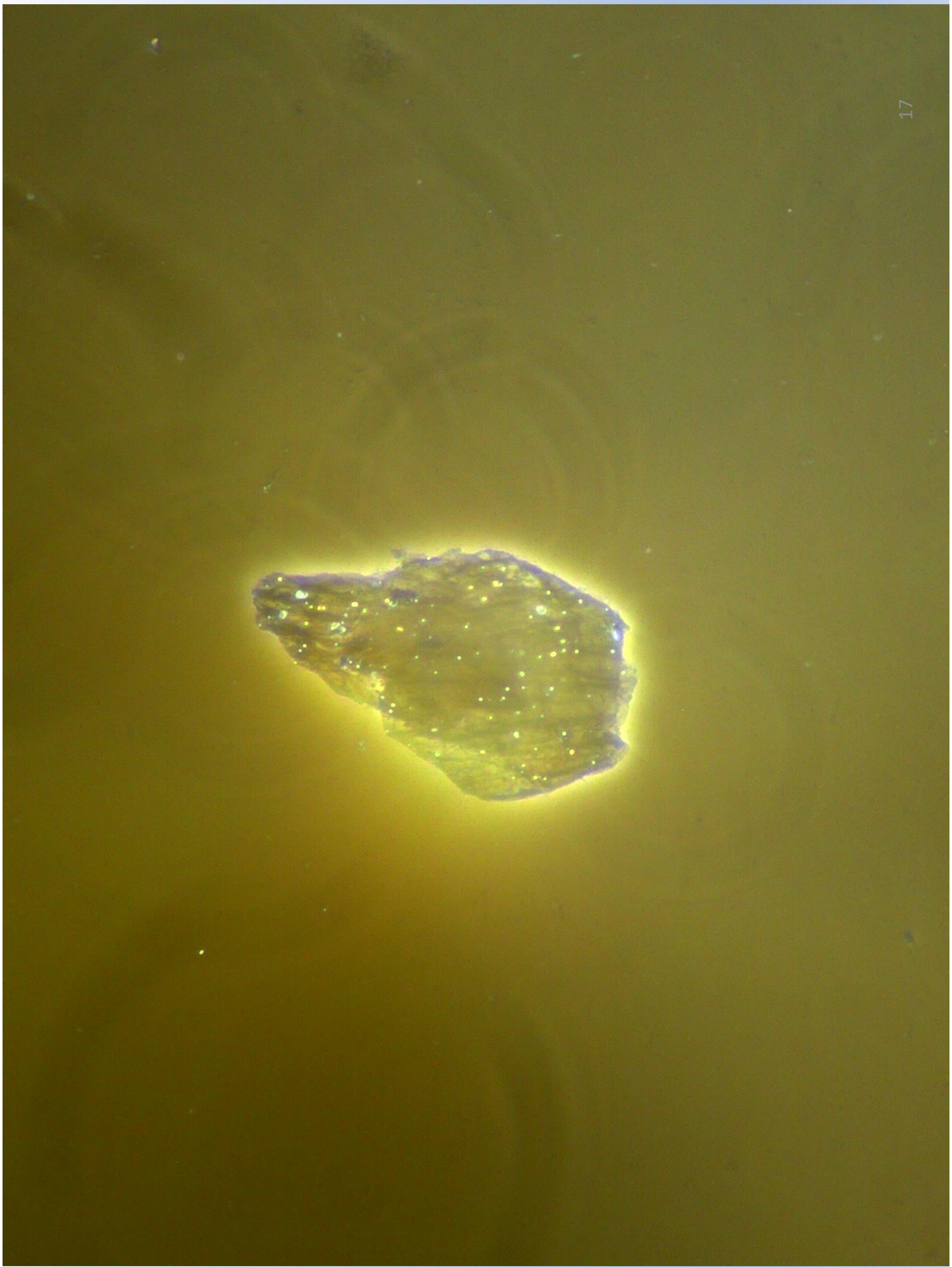
MUESTRA
RD1 60x

PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO



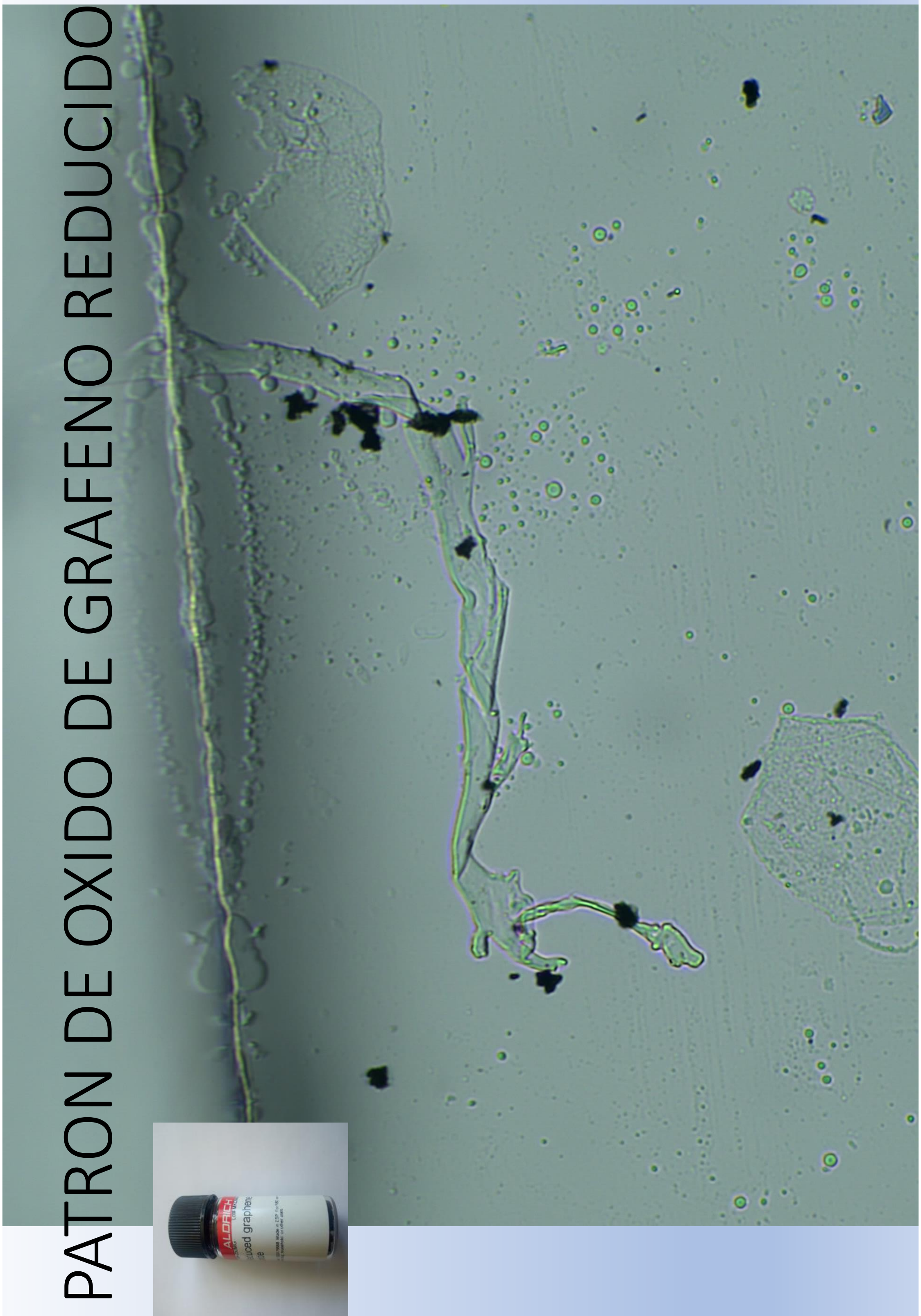


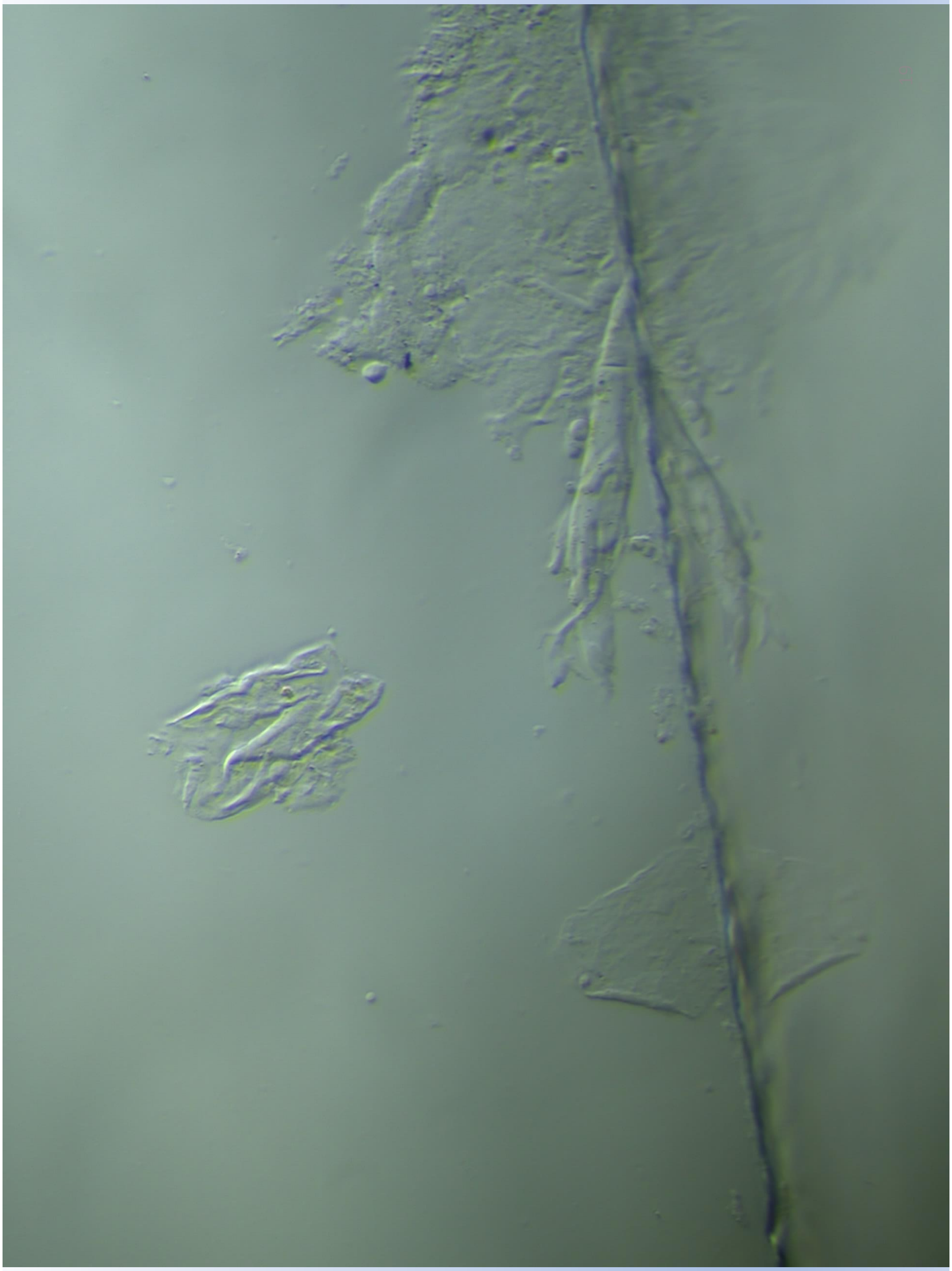
MUESTRA RD1



MUESTRA RD1 (campo oscuro)

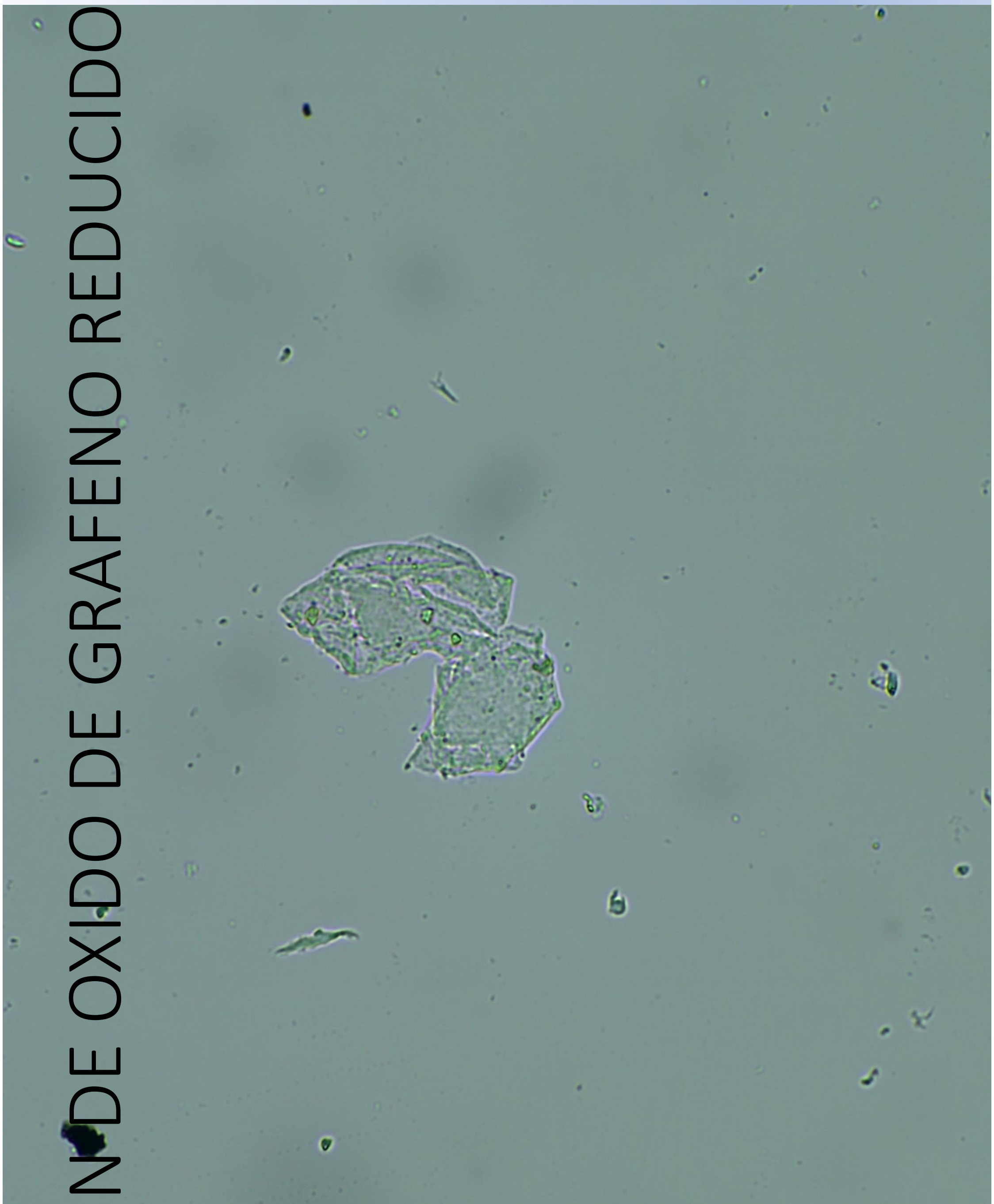
PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO





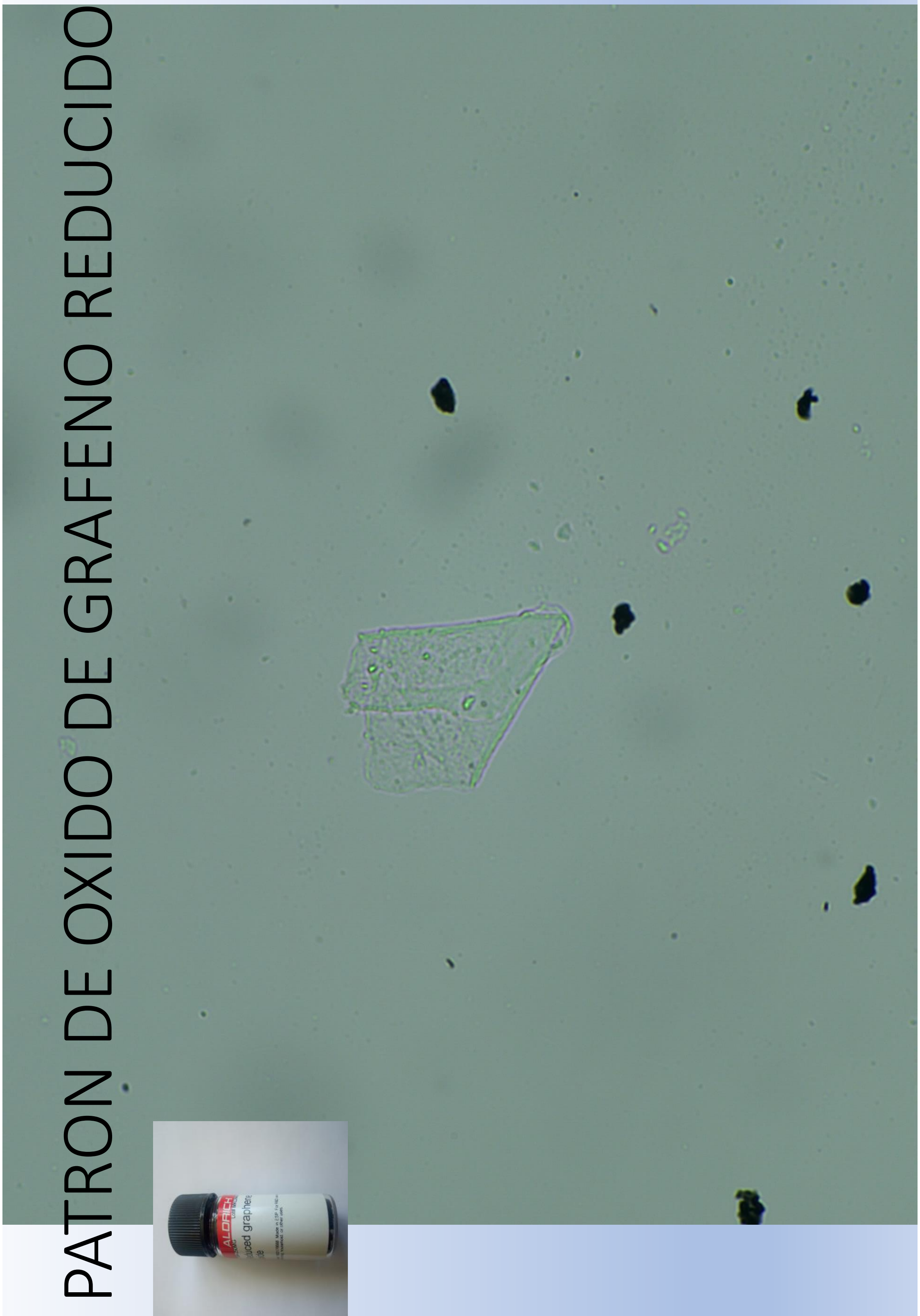
MUESTRA RD1

PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO





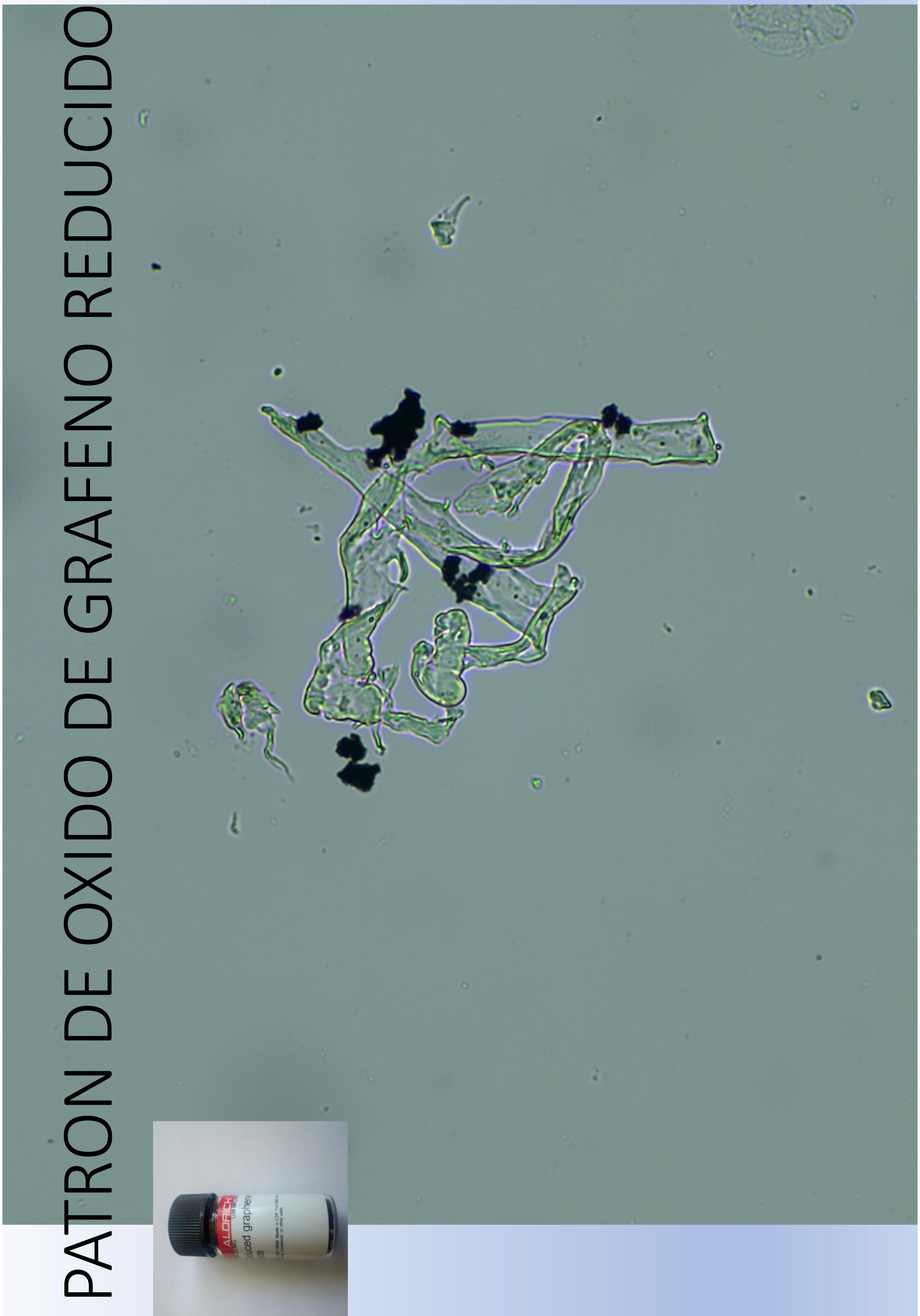
PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO



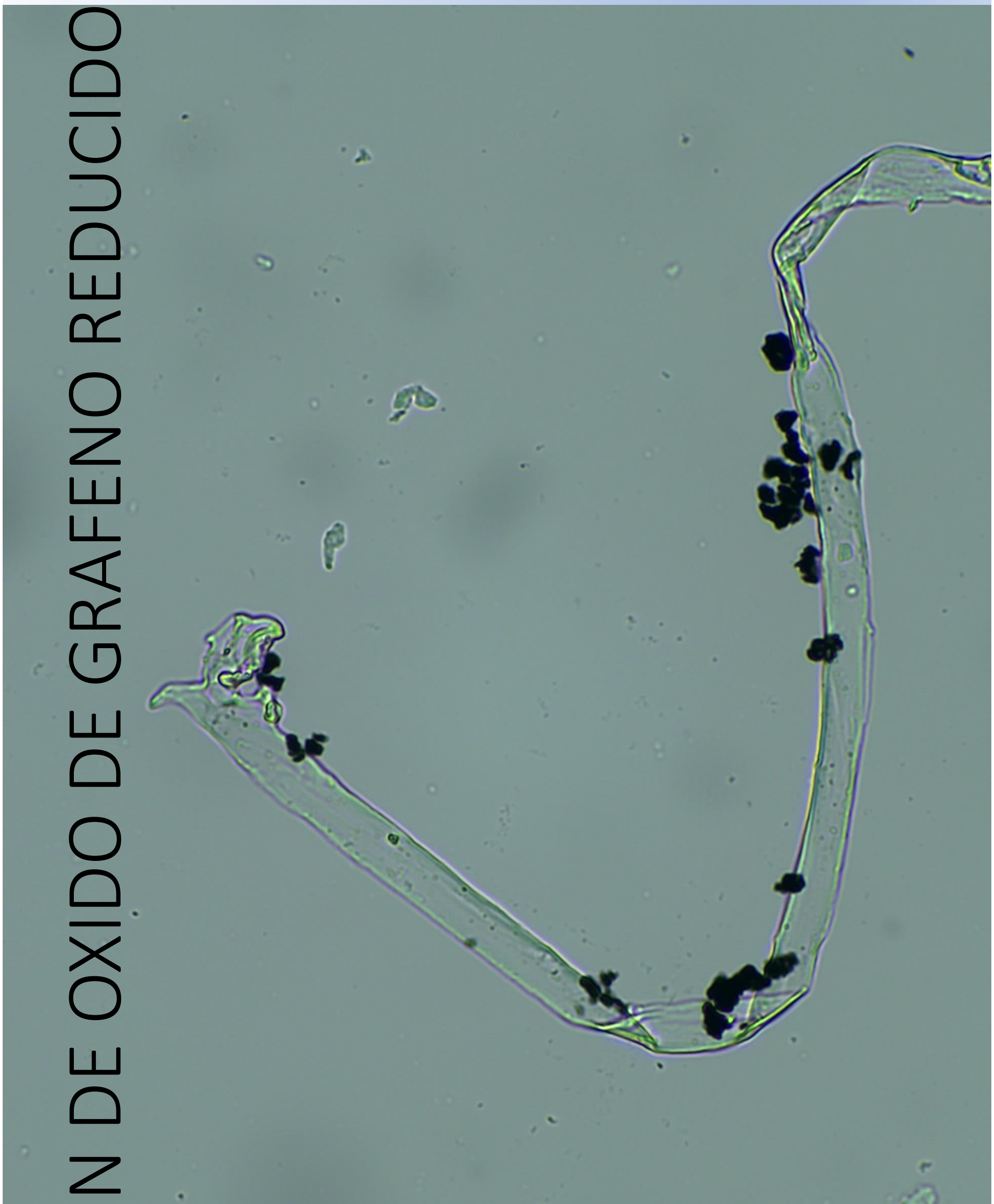


MUESTRA RD1

PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO

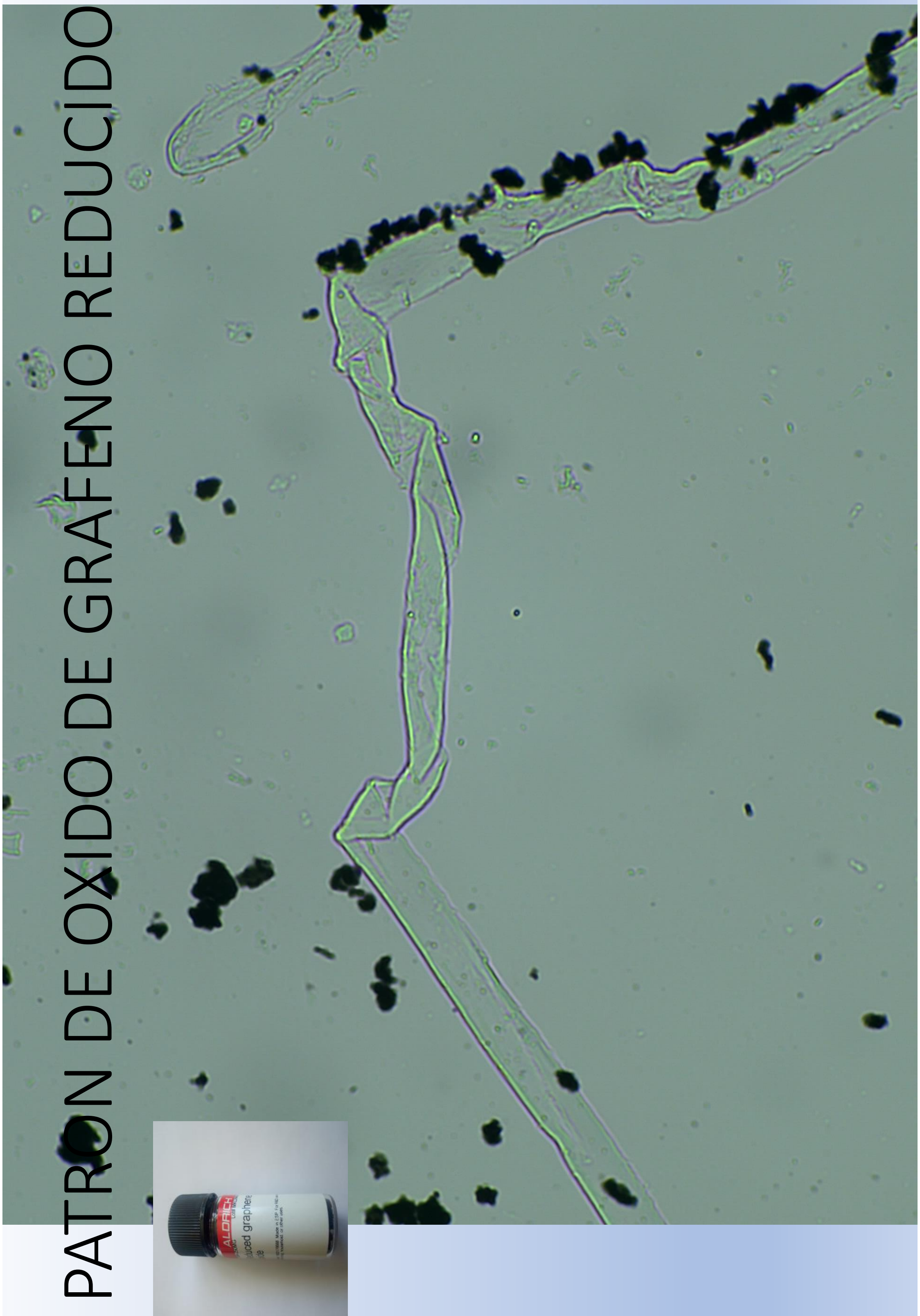


PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO

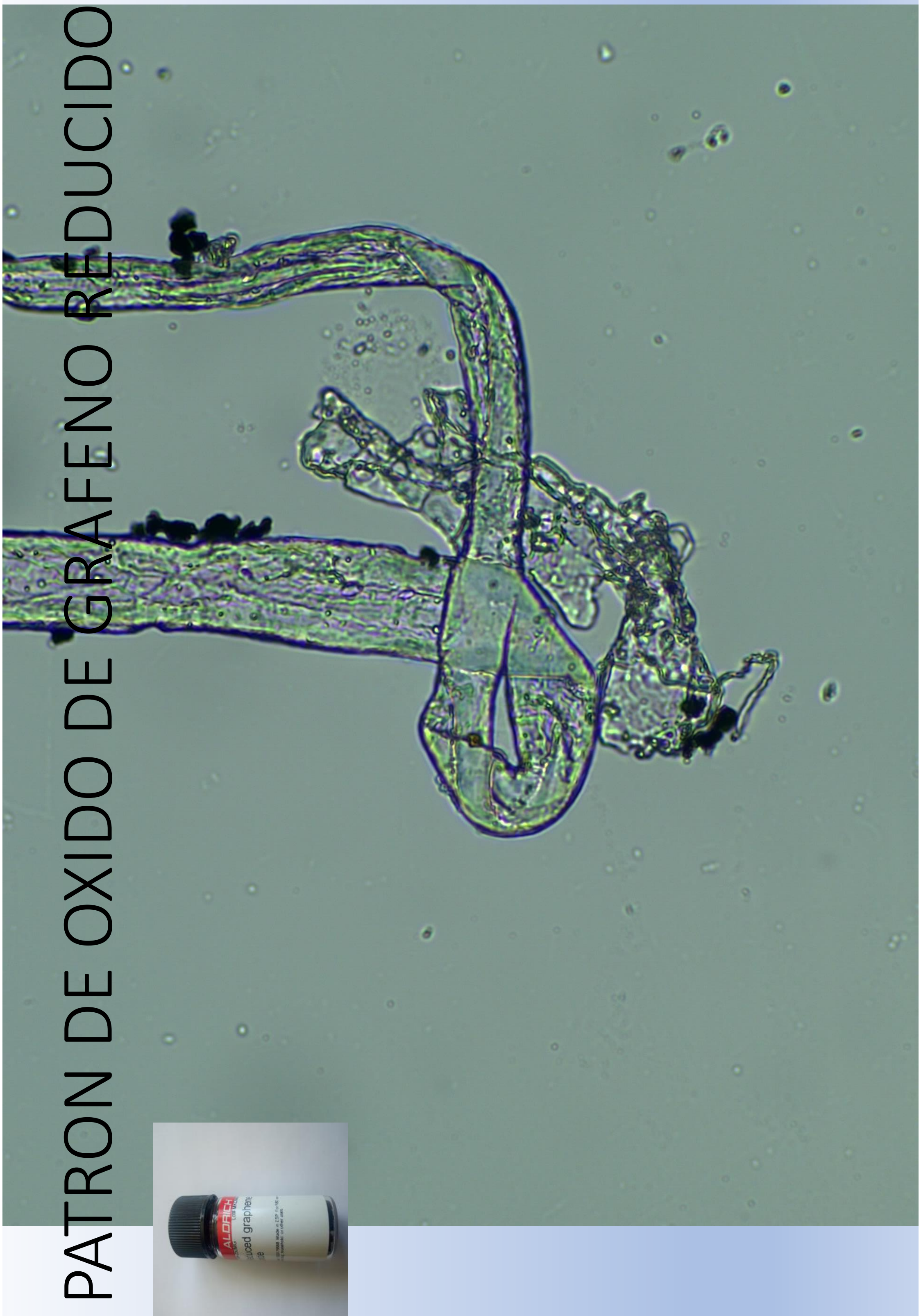




PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO



PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO





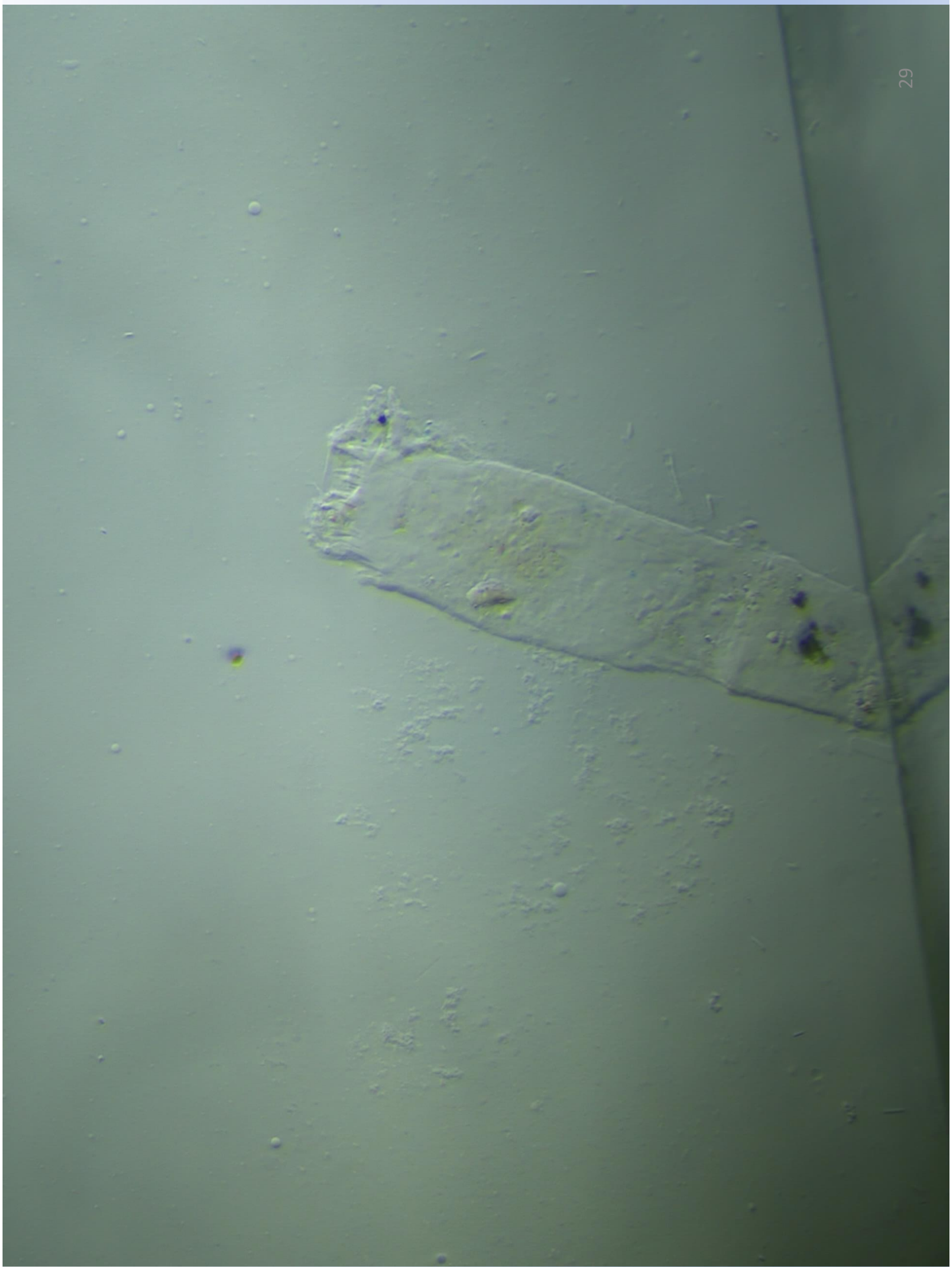
MUESTRA
RD1

jPnCXqeqfqPbwofrC3oSXA==

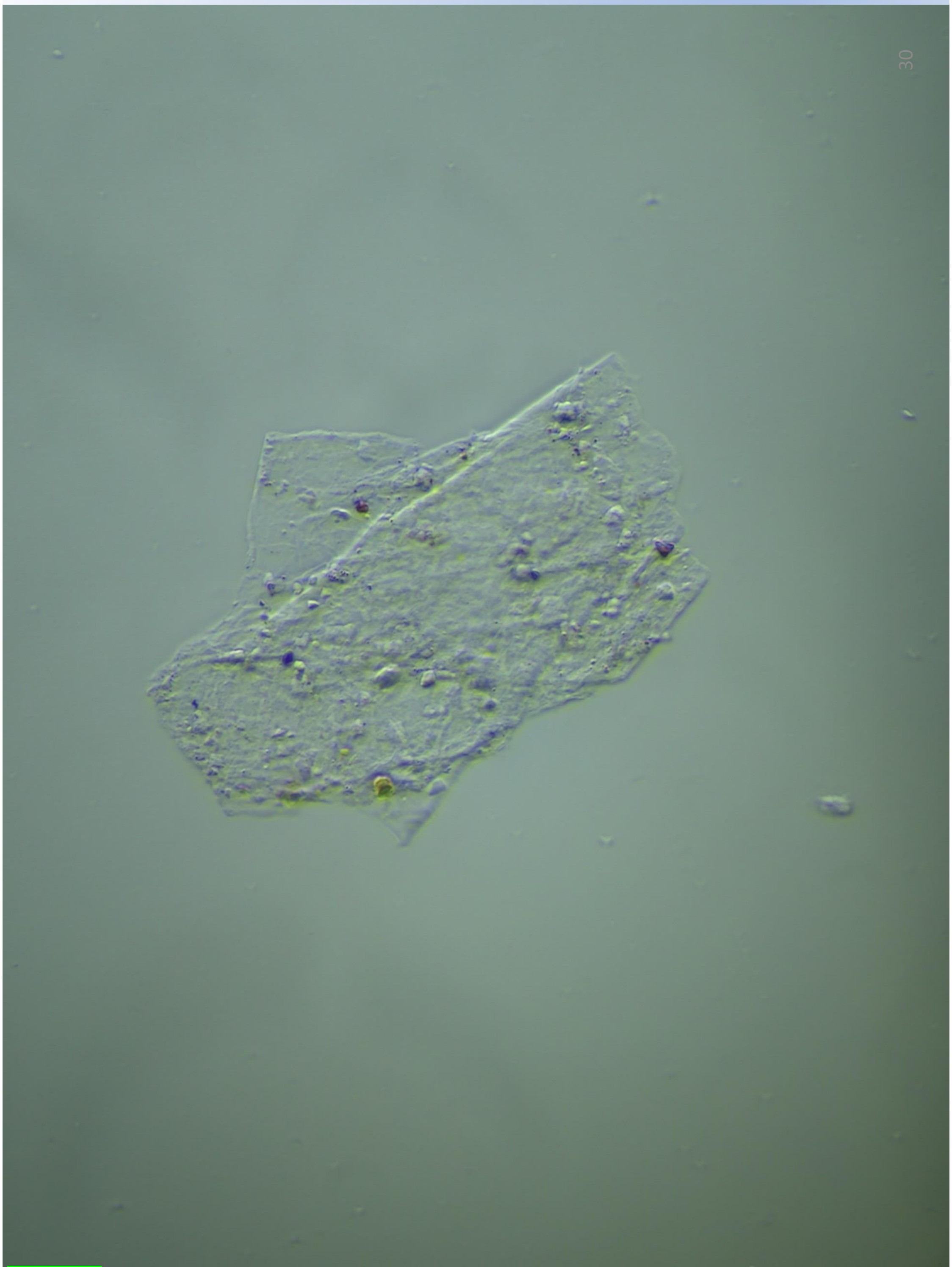
PATRON DE OXIDO DE GRAFENO REDUCIDO







MUESTRA
RD1



MUESTRA
RD1